



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DESENVOLVIMENTO INOVAÇÃO
TECNOLÓGICA EM MEDICAMENTOS
LABORATÓRIO DE PSICOFARMACOLOGIA

POLIANE DA SILVA CALIXTO

ENVOLVIMENTO DOS SISTEMAS GLUTAMATÉRGICO E OXIDONITRÉRGICO
NO EFEITO ANTIDEPRESSIVO E ANSIOLÍTICO DO 4-ALIL-2,6-
DIMETOXIFENOL: UMA ABORDAGEM *IN SILICO* E *IN VIVO*

JOÃO PESSOA - PB
2021

POLIANE DA SILVA CALIXTO

**ENVOLVIMENTO DOS SISTEMAS GLUTAMATÉRGICO E OXIDONITRÉRGICO
NO EFEITO ANTIDEPRESSIVO E ANSIOLÍTICO DO 4-ALIL-2,6-
DIMETOXIFENOL: UMA ABORDAGEM *IN SILICO* E *IN VIVO***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba, como um dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos.

Área de concentração: Inovação tecnológica em medicamentos

Orientador: Dr. Reinaldo Nóbrega de Almeida

Co-orientadora: Dra. Mirian Graciela da Silva Stiebbe
Salvadori

**JOÃO PESSOA – PB
2021**

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

C154e Calixto, Poliane da Silva.

Envolvimento dos sistemas glutamatérgico e oxidonitrérgico no efeito antidepressivo e ansiolítico do 4-alil-2,6-dimetoxifenol : uma abordagem in silico e in vivo / Poliane da Silva Calixto. - João Pessoa, 2021.

113 f. : il.

Orientação: Reinaldo Nóbrega de Almeida.

Coorientação: Mirian Graciela da Silva Stiebbe Salvadori.

Tese (Doutorado) - UFPB/CCS.

1. Medicamento. 2. 4-alil-2,6-dimetoxifenol. 3. Fenilpropanoide. 4. Mecanismo de ação. I. Almeida, Reinaldo Nóbrega de. II. Salvadori, Mirian Graciela da Silva Stiebbe. III. Título.

UFPB/BC

CDU 615.2(043)

Elaborado por Gracilene Barbosa Figueiredo - CRB-15/794

POLIANE DA SILVA CALIXTO

**ENVOLVIMENTO DOS SISTEMAS GLUTAMATÉRGICO E OXIDONITRÉRGICO
NO EFEITO ANTIDEPRESSIVO E ANSIOLÍTICO DO 4-ALIL-2,6-
DIMETOXIFENOL: UMA ABORDAGEM *IN SILICO* E *IN VIVO***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba, como um dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos.

Área de concentração: Inovação Tecnológica em
Medicamentos

Aprovada em: 04 / 06/ 2021

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Diogo Vilar da Fonsêca
Membro externo-UNIVASF



Prof.ª Dra. Francisca Cléa Florenço de Sousa
Membro externo-UFC



Prof.ª Dra. Hilzeth de Luna Freire Pessoa
Membro interno-UEPB



Prof.ª Dra. Temilce Simoes de Assis Cantalice
Membro interno-UEPB



Prof.ª Dra. Mirian Graciela da Silva Stiebbe Salvadori
Co-orientadora-UEPB



Prof. Dr. Reinaldo Nóbrega de Almeida
Orientador-UEPB

Dedico esta tese:

A todos os jovens de origem popular que
sonham em transformar suas vidas
através da educação.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar a **Deus**, por ser meu refúgio e fortaleza em todos os momentos da minha vida pessoal, profissional e acadêmica, permitindo com sua infinita bondade e misericórdia a realização deste sonho.

A minha família, em especial minha **avó Maria** e meu **avô Luis Pedro** (*in memoriam*) que me ensinaram a trilhar os caminhos da vida, sempre com muita fé e coragem, para ser uma pessoa melhor a cada dia.

Aos meus orientadores **Dr. Reinaldo Nóbrega de Almeida** e a **Dra. Mirian G. S. Stiebbe Salvadori** pelo acolhimento no laboratório e orientação incansável, minha eterna gratidão pelo apoio, paciência e dedicação para que pudéssemos concluir este trabalho com êxito.

A **Dra. Adriana Maria Fernandes de Oliveira Gólzio** e o **Dr. Sócrates Gólzio dos Santos** pelos ensinamentos valiosos, compreensão colaboração na realização do presente estudo. Minha gratidão.

Ao **Prof. Dr. José Maria Barbosa Filho** pela colaboração e fornecimento da substância alvo do estudo. Minha gratidão.

Aos amigos e colegas do **Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos (PPGDITM)**, pelo companheirismo em momentos de alegrias, preocupações, mas também de muito aprendizado durante os quatro anos de doutorado.

A todos os membros do **Laboratório de Psicofarmacologia**, em especial **Dr. Álefe Monteiro, Me. Humberto Hugo, Ma. Talita Gonzaga**, entre outros colegas, que de maneira incansável estavam presentes e auxiliando na realização dos experimentos, sempre que necessário.

Ao **Laboratório de Quimioinformática**, da Universidade Federal da Paraíba, em especial ao **Dr. Marcus Tullius Scotti, Dra. Luciana Scotti** e a **MSc. Mayara Maia**, pela colaboração nos testes *in silico*, os quais contribuíram para tornar o estudo mais completo.

A todos os funcionários da Unidade de Produção Animal (UPA) na Universidade Federal da Paraíba em especial a **Dra. Roberta** e **Crispim** pela assistência e cuidado com os animais.

Aos membros da **banca examinadora**, por aceitar o convite e pelas brilhantes contribuições para enriquecer o presente trabalho.

A **Universidade Federal da Paraíba (UFPB)** e aos **docentes** que fazem parte do **PPGDITM** que contribuíram de forma significativa para minha formação profissional, com ensinamentos que levarei para a vida.

A fundação **CAPES** pelo incentivo financeiro, o qual foi relevante para conclusão do presente estudo.

“Educação não transforma o mundo. Educação muda pessoas. Pessoas mudam o mundo”.

Paulo Freire

RESUMO

Os transtornos depressivos e de ansiedade estão entre as condições de saúde mental mais comuns em todo o mundo. Vários mecanismos biológicos têm mostrado importante papel na fisiopatologia, assim como na etiologia e progressão do Transtorno depressivo maior (TDM) e ansiedade. O estresse é o principal fator ambiental que pode causar uma hiperatividade do Eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) um mecanismo importante na resposta ao estresse. O 4-alil 2,6-dimetoxifenol (ADMP) é um fenilpropanoide que mostrou alta atividade antioxidante em estudos anteriores, uma propriedade relevante para fármacos antidepressivos, uma vez que a gravidade dos transtornos de depressão e ansiedade estão correlacionados com o aumento de marcadores de estresse oxidativo. O presente estudo investigou a atividade antidepressiva e ansiolítica do ADMP em camundongos submetidos ao modelo de estresse induzido pela dexametasona e as suas possíveis vias de ação. Para investigar a atividade farmacológica, foram realizados estudos *in silico* e *in vivo*. O ADMP apresentou menor energia de ligação para a via L-arginina/NO/GMPc e o receptor NMDA, não apresentou toxicidade nos parâmetros de mutagenicidade, carcinogenicidade, toxicidade do sistema reprodutivo, irritabilidade do tecido cutâneo no estudo *in silico*. Os animais foram pré-administrados com dexametasona (64µg/kg s.c.) 4h antes da realização dos testes comportamentais, sendo o ADMP (25, 50 e 100 mg/kg i.p) e a imipramina (10 mg/kg i.p.) administrados 45 e 30 minutos respectivamente antes dos testes. Nos estudos *in vivo*, a administração de ADMP produziu efeito antidepressivo nas doses de 25 e 50 mg/kg e ansiolítico nas doses de 25, 50 e 100 mg/kg, sem alterar a atividade locomotora e exploratória na dose 50 mg/kg. Na avaliação dos possíveis mecanismos de ação do ADMP, foi escolhido o teste de nado forçado e a dose de 50 mg/kg. Os resultados sugerem que a atividade antidepressiva pode ser dependente da inibição de mediadores da via NMDA-L-arginina/NO/GMPc. Na avaliação dos parâmetros oxidativos foi observado aumento nos níveis de GSH nos animais submetidos ao tratamento com o ADMP nas doses de 25 e 100 mg/kg em comparação ao grupo tratado com dexametasona. Então o tratamento com o ADMP produziu efeito antidepressivo e ansiolítico, através do envolvimento do receptor NMDA e mediadores da via L-arginina/NO/GMPc, confirmando os resultados *in silico* e atividade antioxidante, no qual demonstrou aumentar os níveis de GSH.

Palavras-chave: Estudo não-clínico, 4-alil-2,6-dimetoxifenol, fenilpropanoide, mecanismo de ação.

ABSTRACT

Depressive and anxiety disorders are among the most common mental health conditions worldwide. Several biological mechanisms have shown an important role in the pathophysiology, as well as in the etiology and progression of MDD and anxiety. Stress is the main environmental factor that can cause hyperactivity of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis (HPA), an important mechanism in the response to stress. 4-allyl 2,6-dimethoxyphenol (ADMP) is a phenylpropanoid that has shown high antioxidant activity in previous studies, a relevant property for antidepressant drugs since the severity of depression and anxiety disorders are correlated with the increase in markers of oxidative stress. The present study investigated the antidepressant and anxiolytic activity of ADMP in mice submitted to the model of stress induced by dexamethasone and possible routes of action. In order to investigate the pharmacological activity, studies *in silico* and *in vivo* were carried out. The ADMP showed lower binding energy for the L-arginine / NO / cGMP pathway and the NMDAR receptor, showed no toxicity in the parameters of mutagenicity, carcinogenicity, toxicity of the reproductive system, irritability of the skin tissue in the *in silico* study. The animals were pre-administered with dexamethasone (64 µg / kg sc) 4h before conducting the behavioral tests, with ADMP (25, 50 and 100 mg / kg ip) and imipramine (10 mg / kg ip) administered 45 and 30 minutes respectively before of the tests. In *in vivo* studies, the administration of ADMP produced an antidepressant effect at doses of 25 and 50 mg / kg and anxiolytic at doses of 25, 50 and 100 mg / kg, without altering locomotor and exploratory activity at the dose of 50 mg / kg. In the evaluation of the possible mechanisms of action of ADMP, the forced swimming test and the dose of 50 mg / kg were chosen, the results suggest that the antidepressant activity may be dependent on the inhibition of mediators of the NMDA-L-arginine / NO / pathway. cGMP. In the evaluation of oxidative parameters, an increase in GSH levels was observed in animals submitted to treatment with ADMP at doses of 25 and 100 mg / kg compared to the group treated with dexamethasone. Then treatment with ADMP produced antidepressant and anxiolytic effects, through the involvement of the NMDA receptor and mediators of the L-arginine / NO / cGMP pathway, confirming the results *in silico* and antioxidant activity, in which it was shown to increase GSH levels.

Keywords: Non-clinical study, 4-allyl-2,6-dimethoxyphenol, phenylpropanoid, mechanism of action.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-HT - Serotonina

5-HTT- Transportador de serotonina

5-HT_{2A} R- receptor de serotonina 2A

ADMP - 4-alil-2,6-dimetoxifenol

AM - Azul de metileno

ANOVA - Análise de variância *one-way*

AT - Transtorno de ansiedade

BDNF - Fator neurotrófico derivado do cérebro

CAR - Carcinogenicidade

CeA - neurônios da amígdala central

cGMP - Monofosfato cíclico de guanosina

DA - Dopamina

DL₅₀ -Dose letal mediana

DSM-V - 5º Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais

E.P.M - Erro padrão da média

GABA - Ácido γ -aminobutírico

GABA_A R-receptor do ácido γ -aminobutírico do tipo A

GR - Receptores glicocorticoides

GSH-Px - Glutathione peroxidase

HPA - Eixo hipotálamo-pituitária-adrenal

i.p. - intraperitoneal

IL-10 - Interleucina-10

IL-1 β - Interleucina-1 β

IL-5 - Interleucina-5

IL-6 - Interleucina-6

IL6R - Receptor de interleucina 6

IL-8 - Interleucina-8

IMAOs - Inibidores seletivos da monoamina oxidase

iNOS - Óxido nítrico sintase induzível

IPT - Irritabilidade do tecido cutâneo

L-Arg - L-arginina

L-NAME - N-nitro-L-arginina metil éster

LMCA - Laboratório Multiusuário de Caracterização e Análise

MAO - Monoamina oxidase

MB - Azul de metileno

mg/kg - Miligrama por quilograma

MUT - Mutagenicidade-

MVD - Molegro virtual docker

NA - Noradrenalina

NADPH - Nucleotídeo adenina nicotinamida fosfato

NMDA - N-metil D-Aspartato

NMDAR - Receptor N-Metil-D-aspartato

nNOS - Óxido nítrico sintase neuronal

NO – Óxido nítrico

NOS - Óxido nítrico sintase

OECD - Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico

PDB - Banco de dados de proteínas

PVN - Núcleo paraventricular do hipotálamo

RCSB - Colaborador de Pesquisa para Bioinformática Estrutural

RNA_m – RNA mensageiro

SERT - Transportador de serotonina

GCs - Guanilato ciclase solúvel

SNC - Sistema nervoso central

SSRI - Inibidores seletivos da recaptação da serotonina

TBARS - Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

TDM - Transtorno depressivo maior

TNF- α - Fator de necrose tumoral alfa

TOC - Transtorno obsessivo compulsivo

TWEEN 80 - Polioxetileno sorbitano monoleato 80

WHO - Organização Mundial da Saúde

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Mecanismos fisiopatológicos do TDM.....	24
Figura 2 - Representação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal.....	29
Figura 3 - Estrutura bidimensional do ADMP	38
Figura 4 - Resumo esquemático das metodologias utilizadas no estudo do ADMP.....	43
Figura 5 - Protocolo OECD 423. Procedimento de ensaio com dose inicial de 300 mg/kg peso corporal.....	47
Figura 6 - Protocolo experimental utilizado na triagem farmacológica comportamental.....	49
Figura 7 - Cronograma experimental de indução do comportamento depressivo-símile.....	50
Figura 8 - Representação dos comportamentos de (A) imobilidade e (B) mobilidade no teste de suspensão da cauda.....	51
Figura 9 - Representação dos principais comportamentos no teste de nado forçado.....	52
Figura 10 - Aparelho utilizado no Teste do Labirinto em Cruz Elevada.....	53
Figura 11 Aparelho utilizado no teste de campo aberto. A) Percentual de permanência no centro. B) Cruzamento de quadrantes. C) Número Rearing (levantamentos).....	54
Figura 12 -Gráfico de visualização da modelagem do receptor 5HT _{2A}	59
Figura 13 - Gráfico Ramachandran do modelo validado.....	59
Figura 14 - Interações 2D e 3D dos aminoácidos do receptor 5-HT _{2A} (A) e das enzimas nNOS (B) e sGC (C) com o ADMP e respectivos antagonistas/inibidores. As ligações de hidrogênios (verde), interações hidrofóbicas (rosa) e eletrostáticas (amarelo).....	62
Figura 15 - Interações 2D e 3D dos aminoácidos do receptor de glicocorticóide (GR) (A), receptor NMDA (B) com ADMP e seus respectivos antagonistas.....	64
Figura 16 - Interações 2D e 3D dos aminoácidos do TNF- α (A) e IL-6 (B) com ADMP e seus respectivos inibidores.....	66
Figura 17 - Efeito do tratamento agudo com ADMP em camundongos no teste de suspensão da cauda.....	69
Figura 18 - Efeito do tratamento agudo com ADMP em camundongos no teste de nado forçado.....	71

Figura 19- Efeito do tratamento agudo com ADMP em camundongos no teste de Labirinto em Cruz Elevado.....	73
Figura 20 - Efeito do tratamento agudo com ADMP em camundongos no teste de campo aberto.....	75
Figura 21- Envolvimento do receptor NMDA na atividade antidepressiva do ADMP no teste de nado forçado, considerando o parâmetro tempo de imobilidade.....	78
Figura 22- Envolvimento do precursor do NO (L-arginina) na atividade antidepressiva de ADMP no teste de nado forçado, considerando o parâmetro tempo de imobilidade.....	79
Figura 23- Envolvimento da NOS na atividade antidepressiva de ADMP no teste de nado forçado, considerando o parâmetro tempo de imobilidade.....	80
Figura 24- Envolvimento do GMPc na atividade antidepressiva do ADMP no teste de nado forçado, considerando o parâmetro tempo de imobilidade.....	81
Figura 25- Efeito da administração da dexametasona, imipramina e ADMP sobre a concentração de GSH no córtex pré-frontal de camundongos.....	82

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Valores de energia obtidos no docking molecular.....	61
Tabela 2 - A predisposição do risco de toxicidade de fenilpropanoide e drogas comercializadas.....	66
Tabela 3 - Percentual de mortes em 14 dias em diferentes doses do ADMP.....	67
Tabela 4 - Efeitos observados do ADMP na triagem farmacológica comportamental.....	68

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	20
2.1 Aspectos gerais do Transtorno Depressivo Maior e do Transtorno de Ansiedade	20
2.3 Ativação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal	27
2.4 Modelo animal de depressão induzida por dexametasona	30
2.5 Estresse Oxidativo	31
2.6 Abordagem farmacológica	33
2.7 Plantas medicinais	36
2.7.1 Óleos essenciais e seus componentes químicos	37
2.7.2. 4-alil-2,6-dimetoxifenol	37
3. RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA	39
4.1 Objetivo Geral	40
4.2 Objetivos Específicos	40
5 MATERIAL E MÉTODOS	41
5.1 Locais da Pesquisa	41
5.2 Material	41
5.2.1 Substâncias	41
5.3.1 Animais	42
5.3.2 Condições experimentais	42
5.3 Aspectos éticos	43
5.4 Método	43
5.5 Validação <i>in silico</i>	44
5.5.1.2 Construção e validação do modelo	44
5.5.2 Docking Molecular	45
5.5.3 Predisposição dos riscos de toxicidade	45
5.6 Validação <i>in vivo</i>	46
5.6.1 Avaliação geral do 4-alil-2,6-dimetoxifenol no sistema nervoso central e da toxicidade aguda	46
5.6.1.1 Determinação da DL ₅₀	46
5.6.1.2 Triagem farmacológica comportamental	48
5.7 Avaliação da atividade antidepressiva e ansiolítica símile	50
5.7.1 Teste de suspensão da cauda	50
5.7.2 Teste de nado forçado	52
5.7.3 Teste de Labirinto em cruz elevado	53

5.7.4 Teste do Campo Aberto	54
5.8 Investigação do mecanismo de ação	55
5.8.1 Avaliação da atividade antidepressiva do 4-Alil-2,6-dimetoxifenol (ADMP) em mediadores da via L-Arginina/NO/ GMPc	55
5.9 Testes Moleculares	56
5.9.1 Dissecção das áreas cerebrais	56
5.9.2 Determinação de parâmetros de estresse oxidativos	56
5.9.2.1 Determinação da concentração de glutathiona reduzida (GSH)	56
7. RESULTADOS	58
7.1 Validação <i>in silico</i>	58
7.1.1 Modelagem molecular por homologia	58
7.1.2 Estudo de docking molecular	60
7.1.2.1 Avaliação da interação entre o ADMP com o receptor (5 HT _{2A}), mediadores da via L-Arginina/NO/cGMP, TNF- α , IL-6, NMDAr, GR e GABA _A	60
7.1.3 Predisposição dos riscos de toxicidade	66
7.2 Validação <i>in vivo</i>	67
7. 2.1 Determinação da dose letal	67
7.2.2. Efeito na triagem farmacológica comportamental 4-alil-2,6-dimetoxifenol	68
7.2.3 Avaliação da atividade antidepressiva-símile do 4-alil-2,6-dimetoxifenol (ADMP)	69
7.2.3.1 Efeito do ADMP no Teste de suspensão da cauda	69
7.2.3.2 Efeito do ADMP no Teste de nado forçado	71
7.2.4.1 Efeito do ADMP no teste de Labirinto em Cruz Elevado	73
7.2.4.2 Efeito do 4-alil-2,6-dimetoxifenol no teste de Campo aberto	75
7.2.5 Mecanismo de ação	78
7.2.5.1 Envolvimento dos receptores NMDA no efeito do tipo antidepressivo do ADMP	78
7.2.5.2 O efeito do 4-alil-2,6-dimetoxifenol (ADMP) em mediadores da via L-Arginina/NO/ GMPc	79
7.2.6 Determinação de parâmetros de estresse oxidativo	81
6. DISCUSSÃO	83
7. CONCLUSÃO	93
8. PERSPECTIVAS	94
9. REFERÊNCIAS	95

1. INTRODUÇÃO

O transtorno depressivo maior (TDM) é um dos transtornos mentais mais prevalentes em todo o mundo. Sua etiopatogenia é resultado de uma complexa interação entre fatores biológicos e psicossociais que não estão totalmente elucidados e está relacionado com outras comorbidades, com forte relação para o transtorno de ansiedade generalizada, no qual pode ser um fator de risco, dobrando a probabilidade de o indivíduo desenvolver TDM (GUTIÉRREZ-ROJAS et al., 2020).

Os transtornos de depressão e ansiedade são condições de saúde mental recorrente e incapacitantes, com prejuízos no funcionamento físico, social e ocupacional (CROWE et al., 2020), resultando em dificuldades de compreender e controlar as emoções sociais, déficit na capacidade de ler sinais de ameaça e segurança interpessoal, reduções das interações sociais (KUPFERBERG; BICKS; HASLER, 2016) e incapacidade para o trabalho (LINDER et al., 2020). Além da diminuição na qualidade de vida, estes transtornos apresentam alta prevalência de comorbidades como doenças crônicas: diabetes e doenças cardíacas, o que eleva um custo econômico considerável aos sistemas de saúde (RIDLEY et al., 2020).

O estresse tem papel crucial na fisiopatologia no TDM, por causar anormalidades em estruturas cerebrais como hipocampo, córtex pré-frontal medial, como também estimula processos neurotóxicos: desregulação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA), inflamação, estresse oxidativo e distúrbios de neurotransmissores, que interagem entre si e podem conduzir à progressão e à gravidade do transtorno (BELLEAU; TREADWAY; PIZZAGALLI, 2019), além de estar implicado na fisiopatologia da ansiedade e no comprometimento das funções cognitivas (KELLER et al., 2017).

Atualmente vários medicamentos antidepressivos estão disponíveis para pacientes com transtorno de depressão e ansiedade, no entanto apresentam algumas limitações, como baixa probabilidade de remissão completa (30% dos pacientes não conseguem apresentar remoção de quase todos os sintomas), apresentam baixa tolerabilidade e alguns efeitos colaterais, assim como os medicamentos ansiolíticos que apresentam eficácia geral insuficiente em tratamentos de curto e longo prazo (SHAFIEE et al., 2018).

Vários fitoterápicos têm demonstrado efeito ansiolítico em estudos não-clínicos *in vitro* e em animais, devido a propriedades farmacodinâmicas e antioxidantes, atribuída a constituintes como alcalóides, terpenóides / saponinas e polifenóis (LEE; BAE, 2017; SAVAGE et al., 2017).

As plantas medicinais aromáticas contêm metabólicos bioativos, como óleos essenciais com atividade farmacológica relevante, dentre as quais estão, atividade anti-inflamatória, antioxidante, ansiolítica e antidepressiva em modelos animais (ALI et al., 2015a).

Dentre as substâncias bioativas, os fenilpropanoides estão presentes em diferentes óleos essenciais, citados em vários estudos por possuírem atividade antidepressiva (CARVALHO et al., 2014; OPITZ; NES; GERSHENZON, 2014; SWAMY; AKHTAR; SINNIHA, 2016) e ansiolítica (DE ANDRADE et al., 2020).

Considerando a grande quantidade de fenilpropanoides (álcool cinâmico (DE ANDRADE et al., 2020), metil-eugenol (WANG et al., 2015), orto-eugenol, ácido cafeico (DESHMUKH et al., 2019), com estrutura similar ao 4-alil-2,6-dimetoxifenol (ADMP), que apresentam relevantes propriedades no sistema nervoso central, sendo o ADMP escasso de estudos na psicofarmacologia, o presente trabalho é de grande significado científico, pois investiga propriedades farmacológicas em modelos animais de uma substância promissora para o tratamento do transtorno depressivo maior e o transtorno de ansiedade generalizada.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Aspectos gerais do Transtorno Depressivo Maior e do Transtorno de Ansiedade

A saúde mental e física são condições primordiais para a qualidade de vida do indivíduo em sociedade. No entanto, eventuais acontecimentos da vida moderna como: alta carga de trabalho, pressão de tempo para realizar determinadas atividades, tendo como consequência exaustão emocional, adversidades principalmente na infância, pobreza extrema, violência doméstica, comunitária e escolar, além de separação parental no início da vida, pode contribuir para a susceptibilidade aos transtornos mentais (BURUCK et al., 2020; SCHIELE; GOTTSCHALK; DOMSCHKE, 2020; PERVANIDOU et al., 2020).

As desordens ou transtornos neurocomportamentais são caracterizadas por alterações do comportamento associadas a danos ou disfunções no sistema nervoso central (SNC), podendo ser consequência tanto de fatores genéticos como ambientais (KALUEFF et al., 2015).

Dentre as desordens mais prevalentes em nossa sociedade, podemos destacar a depressão e ansiedade (GOODWIN, 2015). O transtorno depressivo maior (TDM), também conhecido como depressão é um distúrbio psiquiátrico altamente debilitante, o qual afeta a qualidade de vida do indivíduo e assim como os transtornos de ansiedade, a depressão contribui para a carga global de doenças, sendo considerada grave problema de saúde pública (JAMES et al., 2018; PITSILLOU et al., 2020).

O TDM pode ser caracterizado por pelo menos um episódio depressivo que pode durar 2 semanas com alterações cognitivas, fisiológicas e comportamentais (OTTE et al., 2016), o Manual Diagnóstico e Estatístico de Revisão (DSM-V), descreve um conjunto de sintomas, como: humor deprimido, diminuição acentuada do interesse ou prazer, perda ou ganho de peso sem dieta, insônia ou hipersonia, agitação ou retardo psicomotor, fadiga ou perda de energia, sensação de inutilidade ou culpa excessiva, menor capacidade de pensar ou concentrar-se e pensamentos recorrentes de morte (ASSOCIAÇÃO AMERICANA DE PSIQUIATRIA, 2014).

O diagnóstico para o TDM é exclusivamente clínico, de acordo com os critérios presentes no DSM-V, sendo um episódio depressivo maior caracterizado por no mínimo cinco dos sintomas relatados acima, durante o período de duas semanas, em que requer a presença de pelo

menos um dos sintomas: (1) humor deprimido ou (2) perda de interesse ou prazer (ASSOCIAÇÃO AMERICANA DE PSIQUIATRIA, 2014).

Apesar de, historicamente, dividir-se a ansiedade e depressão como transtornos distintos, estudos recentes têm demonstrado uma forte correlação entre eles, tendo em vista que a depressão muitas vezes pode vir acompanhada pela ansiedade, mostrando um padrão de vulnerabilidade específica com maior gravidade e duração dos sintomas (GROEN et al., 2020; IONESCU et al., 2014; LAMERS et al., 2011).

A ansiedade é caracterizada por um sentimento constante de apreensão e inquietação a situações que podem representar ameaça, perigo ou até mesmo algum desafio cotidiano (KAUR; SINGH, 2017).

Em muitos casos é condicionada ao medo, no entanto são considerados estados emocionais distintos, uma vez que o medo é uma resposta a uma ameaça específica e real, com curta duração e que é dissipada após a ameaça ser evitada, enquanto que a ansiedade reflete um sentimento de hipervigilância prolongada e incerteza a uma situação que tende a ser desconhecida e que pode resultar em ameaça ambígua (SYLVERS; LILIENFELD; LAPRAIRIE, 2011).

Tanto o medo como a ansiedade são emoções que podem ser consideradas respostas adaptativas naturais, com propósito de proteção (KEIL et al., 2016). No entanto, a ansiedade quando em excesso, é definida como patológica: Transtorno de Ansiedade, apresentando sintomas que são persistentes nos quais podem causar sofrimento significativo, com comprometimento das atividades cotidianas e redução da qualidade de vida (BALDWIN et al., 2014).

De fato, o transtorno de ansiedade envolve sintomas cognitivos, fisiológicos e comportamentais. Exemplos de sintomas cognitivos: sensação de medo, insegurança, pensamentos catastróficos, irritabilidade, nervosismo e mal-estar indefinido. Já nos sintomas fisiológicos o indivíduo pode apresentar insônia, taquicardia, falta de ar, sudorese, distúrbios intestinais e tensão muscular. Todavia, os sintomas comportamentais envolvem comportamento fóbico e compulsivo (BRAGA, 2010).

Os transtornos de ansiedade podem estar etiológicamente relacionados com outras doenças, no entanto de acordo com o DSM-V os transtornos de ansiedade podem ser classificados em transtorno de ansiedade de separação, fobia específica, transtorno de ansiedade

social ou fobia social, transtorno de pânico, especificador do ataque de pânico, agorafobia, transtorno de ansiedade generalizada, transtorno de ansiedade induzida por substância/medicamento, transtorno de ansiedade devido a outra condição médica, transtorno de ansiedade especificado e transtorno de ansiedade não especificado (ASSOCIAÇÃO AMERICANA DE PSIQUIATRIA, 2014).

Os transtornos de ansiedade e depressivos estão entre as condições de saúde mental mais comum em todo o mundo com prevalência entre 10% a 16% respectivamente ao longo da vida. (XU et al., 2014).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS) os transtornos de ansiedade e depressão têm aumentado nos últimos anos, o número total estimado de pessoas que vivem com depressão é de 18,4% e ansiedade 14,9% entre 2005 e 2015. Assim como acontece com a depressão, transtornos de ansiedade são mais prevalentes entre mulheres do que homens. (SCHUCH et al., 2014; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017).

Na maioria dos países não há informações precisas quanto a prevalência de depressão ao longo da vida, entretanto alguns estudos indicam uma variabilidade quanto as taxas em diferentes países, variando entre 6,6% (Japão), 17% (Holanda), 1,5% (Taiwan), 9,2% (Alemanha Ocidental), 9,6% (Edmonton, Canadá) e 18,4% (Brasil) (BARROSO; MELO; GUIMARÃES, 2014; BROMET et al., 2011).

De acordo com a OMS (2017), o Brasil lidera o mundo em prevalência de transtornos de ansiedade e ocupa o quinto lugar em taxas de depressão (DE SOUZA; MACHADO-DE-SOUSA, 2017).

Os transtornos mentais como depressão e ansiedade contribuem para elevada associação com alto risco de comorbidade e em uma grande variedade de doenças, como o câncer, doenças endócrinas e cardíacas (FERRARI et al., 2013; HUFFMAN; CELANO; JANUZZI, 2010; KESSLER; BROMET, 2013).

Estudos têm mostrado uma alta frequência de transtornos de ansiedade e depressão correlacionados com o risco de suicídios (GAMAGE et al., 2020; SONMEZ et al., 2020), sendo a depressão um dos principais fatores para o suicídio, com a existência de correlatos biológicos, como a redução do volume do hipocampo (MARCHAND et al., 2012), o envolvimento do sistema serotoninérgico com associação de polimorfismos no gene 5HTR2A aumentando a expressão do receptor (LUO; HE; LIU, 2019; MIRKOVIC et al., 2016), além da neuroinflamação (COURTET et al., 2016).

Os transtornos de ansiedade e depressão compartilham características comuns, como alterações no sistema de neurotransmissão, além da desregulação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) (BURGESE; BASSITT, 2015).

Considerando a complexidade dos transtornos de ansiedade e depressão, faz-se necessário uma melhor compreensão da sua fisiopatologia e diagnóstico, importantes para o desenvolvimento de medicamentos com uma melhor eficácia e com menores efeitos adversos.

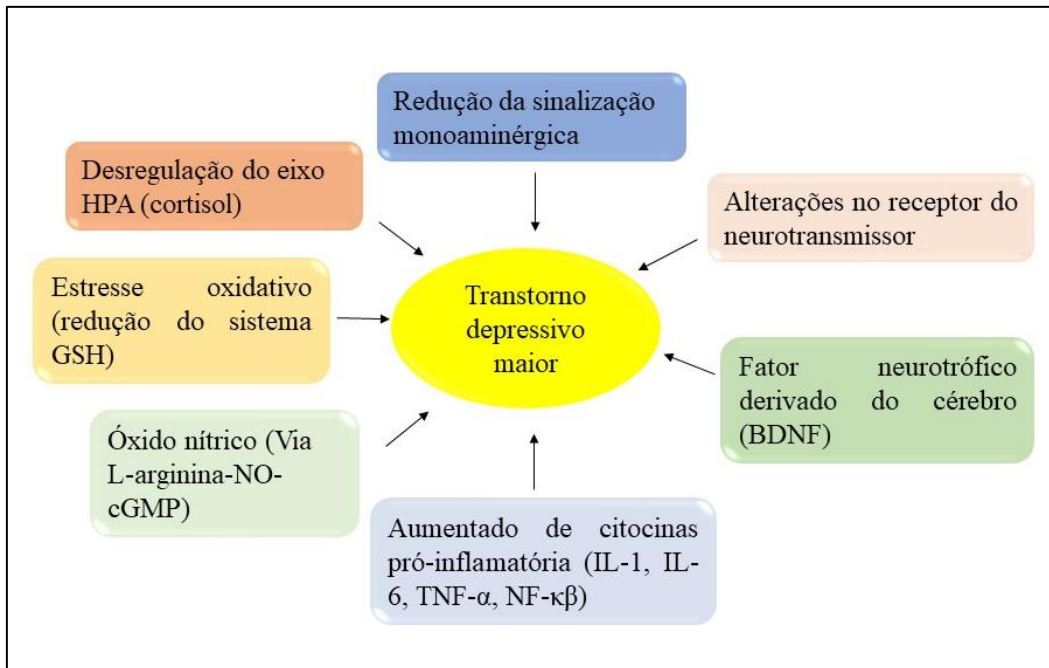
2.2 Fisiopatologia do transtorno depressivo maior e transtorno de ansiedade

Apesar dos grandes avanços no entendimento da neurobiologia do TDM, sua fisiopatologia não está totalmente elucidada, nenhum dos mecanismos estabelecidos explica todos os aspectos da patologia (LUO; HE; LIU, 2019), dificultando a eficácia dos tratamentos disponíveis.

O TDM é considerado um transtorno multifatorial, envolvendo fatores genéticos (DONG; WONG; LICINIO, 2009), epigenéticos e ambientais (SAAVEDRA et al., 2016). Esses fatores agindo por meio de respostas imunológicas e endócrinas podem iniciar mudanças estruturais e funcionais em muitas regiões do cérebro, que resultam em redução da neurogênese e neurotransmissão disfuncional (JESULOLA; MICALOS; BAGULEY, 2018).

Vários mecanismos biológicos têm mostrado importante papel na fisiopatologia, assim como na etiologia e progressão do TDM, como pode ser visto na Figura 1.

Figura 1- Mecanismos fisiopatológicos do TDM



Fonte: Adaptado de CHOPRA; KUMAR; KUHAD, 2011.

Um dos primeiros modelos sugeridos por muito tempo para a etiologia da depressão, foi a teoria monoaminérgica, baseada na deficiência de monoaminas como a serotonina (5-HT), noradrenalina (NA) e dopamina (DA) no SNC. Essa foi postulada a partir de resultados farmacológicos obtidos de testes clínicos com a iproniazida e imipramina; fármacos que influenciam na modulação da transmissão monoaminérgica, por inibirem a ação da enzima monoamino oxidase (MAO) e a recaptação de 5-HT e NA para o neurônio pré-sináptico, sendo observado uma diminuição dos sintomas da depressão (CRANE, 1957; KUHN, 1958).

Os níveis alterados da atividade da MAO no SNC ou alterações de seus receptores em número e sensibilidade, estão associados a mudanças nos níveis de neurotransmissores como DA, NA e 5-HT, implicando assim em uma variedade de transtornos mentais, incluindo depressão e ansiedade (DUNCAN; JOHNSON; OU, 2012; GARCIA-MIRALLES et al., 2016; HUANG et al., 2019).

Quanto à fisiopatologia da ansiedade, os sintomas estão envolvidos com perturbações na modulação do SNC, resultando em aumento da excitabilidade neural (ADWAS; JBIREAL; AZAB, 2019). Além disso, alguns sistemas de neurotransmissores são implicados na fisiopatologia dos transtornos de ansiedade, dentre os quais estão o sistema GABAérgico (NUSS, 2015), glutamatérgico (BEITCHMAN et al., 2020), serotoninérgico (ŽMUDZKA et al., 2018) e noradrenérgico (MCCALL et al., 2015).

Alterações na função de receptores, como polimorfismos genéticos, podem contribuir para anormalidades na neurotransmissão, e estão envolvidas na susceptibilidade à depressão e ansiedade e até mesmo, a redução da resposta ao tratamento. Como exemplo, cita-se o caso do polimorfismo de nucleotídeo único C(-1019) G na região promotora do gene que codifica o receptor de serotonina 1A (5HT1AR), indivíduos homozigoto para G apresenta alteração na ligação de repressores transcrpcionais e consequentemente redução da repressão, aumentando assim a expressão do 5HT1AR no núcleo da rafe, causando diminuição do disparo de neurônios serotoninérgicos (YOHN; GERGUES; SAMUELS, 2017).

Por sua vez, o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) desempenha um papel importante no crescimento e sobrevivência neuronal, pois atua como um modulador da neurotransmissão e contribui para a plasticidade neuronal (BATHINA; DAS, 2015). Evidências sugerem que o BDNF está associado à fisiopatologia do TDM, uma vez que seus níveis periféricos foram encontrados diminuídos em pacientes com TDM (KISHI et al., 2018). A proteína BDNF e o seu RNAm foram identificados reduzidos na maioria das áreas do cérebro, incluindo o bulbo olfatório, córtex, hipocampo, prosencéfalo basal, mesencéfalo, hipotálamo, tronco cerebral e medula espinhal; tais resultados estão associados a doenças neurodegenerativas, incluindo a depressão (BATHINA; DAS, 2015).

A hipótese inflamatória é um importante fator para explicar a hiperatividade imune e a produção desregulada de citocinas em pacientes depressivos (JEON e KIM, 2017; ZOU; YANG, 2018). A gravidade da depressão foi associada a altos níveis séricos de interleucinas IL-1 β , IL-5, IL-6, IL-8, IL-10 e do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) (DAHL et al., 2014; YOSHIMURA, KISHI e IWATA, 2019).

Um estudo clínico com pacientes depressivos, mostrou concentrações séricas elevadas de TNF- α e IL-6 em pacientes depressivos associadas a gravidade dos sintomas (FAN et al., 2017). Além disso, a disfunção imunológica, principalmente nos níveis de IL-6 e TNF- α (WANG et al., 2019) podem ocasionar alteração nos mecanismos neuroendócrinos induzidos pelo estresse, como elevação dos níveis de cortisol.

Em uma condição de estresse, as fibras nervosas centrais liberam neurotransmissores como noradrenalina e hormônios glicocorticóides que afetam leucócitos, resultando na expressão profunda de redes de genes de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β , IL-6 e TNF- α , além disso, a ativação de receptores de citocinas no hipotálamo que desencadeia a produção de glicocorticóides pelo eixo HPA (IRWIN; COLE, 2011).

Outra via envolvida na patogenicidade da depressão, é a via L-arginina/NO/GMPc, pois desempenha um papel na regulação de funções comportamentais (MACCALLINI, et al., 2015). A produção excessiva de óxido nítrico (NO) por mediadores da via L-arginina/NO/GMPc está relacionada com o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas e transtornos de humor como a depressão, por aumentar a neurodegeneração, resultante do processo inflamatório no cérebro (YUSTE et al., 2015; MILLER; RAISON, 2017).

A enzima óxido nítrico sintase neuronal (nNOS) está localizada dentro da membrana celular pós-sináptica e é fisicamente ligada ao receptor de glutamato do subtipo N-metil-D-aspartato (NMDA), através da proteína PSD95. Evidências sugerem que a hiperatividade de receptores NMDA (NMDA_R), pode levar ao influxo de Ca²⁺ anormal nos neurônios pós-sinápticos com super estimulação da nNOS (MACCALLINI; AMOROSO, 2016). Níveis de expressão de nNOS e NO, se encontraram elevados no hipotálamo, hipocampo e córtex pré-frontal em modelos de animais exposto ao estresse, para indução do comportamento do tipo depressivo (JOCA et al., 2019).

O NO tem como principal alvo, a guanilato ciclase solúvel (sGC), a qual ativa a produção de monofosfato cíclico 3', 5' guanosina (GMPc), este por sua vez ativa canais iônicos, proteínas cinases e fosfodiesterases, vias de sinalização associadas à morte celular induzida pôr NO (PICÓN-PAGÈS; GARCIA-BUENDIA; MUÑOZ, 2019; RONCHETTI et al., 2019).

A via glutamatérgica, também explica parte da fisiopatologia do TDM. Proposta em 1990, a partir um estudo envolvendo antagonistas do NMDA_R como ácido 2-amino-7-fosfonoheptanóico (AP-7) e Dizolcipina também conhecido como MK-801, mostrou atividade antidepressiva em testes comportamentais (HASHIMOTO, 2019).

Atualmente, sabe-se que os NMDA_R desempenham papéis críticos no sistema nervoso, principalmente na memória e aprendizagem, são implicados em doenças e distúrbios neurológicos como acidente vascular cerebral, doença de Alzheimer (KODIS et al., 2018), esquizofrenia, epilepsia e depressão (REGAN et al., 2019).

O estresse oxidativo também está implicado tanto na depressão quanto na ansiedade (BOUAYED; RAMMAL; SOULIMANI, 2009). O cérebro é um grande consumidor de oxigênio, além de ser rico em lipídios suscetíveis à peroxidação, sendo considerado sensível ao estresse causado por espécies reativas de oxigênio (EROs), que pode oxidar e causar alterações nas funções do RNA, DNA, proteínas e lipídios, e consequentemente danos aos neurônios (BAKUNINA; PARIANTE; ZUNSZAIN, 2015).

Estudos não-clínicos relataram uma ligação entre a exposição ao estresse e a diminuição dos níveis e enzimas relacionadas a GSH (HASSAN et al., 2020; RAI et al., 2019). Os glicocorticóides (GCs) são hormônios secretados pelas suprarrenais em resposta ao estresse, envolvidos na atividade do eixo HPA, os GCs podem contribuir para redução nos níveis de GSH em estudos *in vitro* e *in vivo* mostrando ter um impacto negativo nos níveis de antioxidantes (BEYTUT et al., 2018; ZALACHORAS et al., 2020).

O TDM é associado a disfunção do eixo HPA, que envolve consequentemente a secreção de glicocorticoides em excesso (NGUYEN et al., 2018). Os receptores glicocorticoides (GR) são responsáveis por mediar os efeitos diretos dos glicocorticoides. Por sua vez, a ativação persistente destes receptores por altos níveis de glicocorticoides pode resultar em dano neural, com alterações moleculares e consequentemente comportamentais, resultando em TDM e outras doenças neuropsiquiátricas (CANET et al., 2018; LIN et al., 2016).

O aumento da secreção de glicocorticóides após a exposição a uma condição de estresse, leva a um aumento na liberação de glicose por meio da gliconeogênese, resultando em uma respiração mitocondrial e fosforilação oxidativa aprimorada, aumentando ainda mais a geração de espécies reativas, como produção espontânea de superóxido ($O_2^{\cdot -}$) (SPIERS et al., 2015). O L-lactato (produto da glicólise aeróbia pelos neurônios) potencializa a atividade do receptor NMDA, aumentando o cálcio intracelular (YANG et al., 2014).

Níveis elevados de glicocorticóides tem contribuído para um maior risco de desenvolver sintomas de ansiedade, mania e psicose entre os indivíduos que receberam prescrição de medicamentos glicocorticoides (JUDD et al., 2014). Além dos níveis elevados de glicocorticoides, o hormônio liberador de corticotropina (CRH) têm sido associados à transtornos depressivos e o transtorno de ansiedade generalizada (RAGLAN; SCHMIDT; SCHULKIN, 2017).

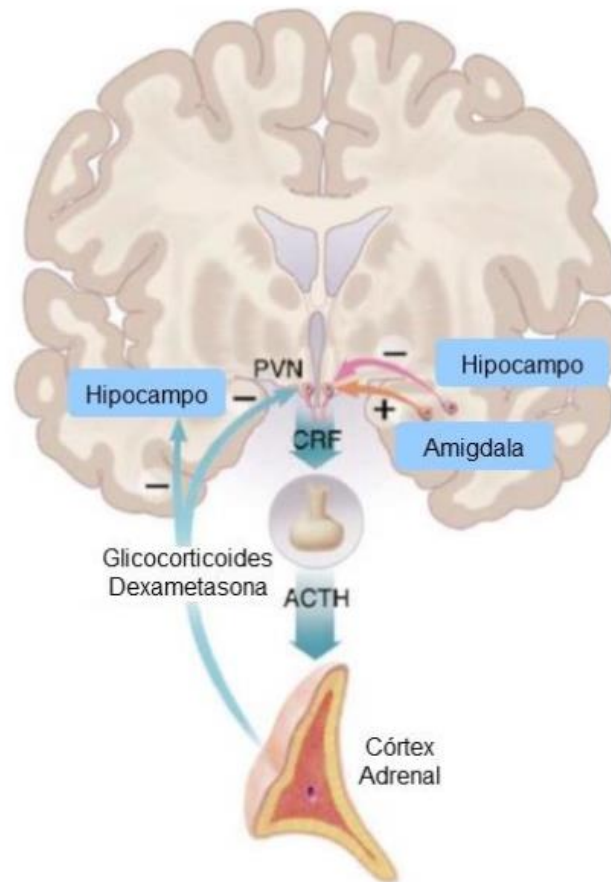
2.3 Ativação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal

O estresse é definido como um estado fisiológico de homeostase perturbada, após percepção de perigo, podendo afetar várias funções do corpo, como sistema imunológico, reprodução, cognição e comportamento, os últimos devido ao grande número de circuitos

neurais envolvidos, incluindo córtex pré-frontal, hipocampo, amígdala e hipotálamo (HOLSBOER e ISING 2010; REIN et al., 2019).

O eixo HPA (Figura 2) é importante no controle da homeostase e na resposta ao estresse, a sua regulação depende de algumas estruturas e moléculas reguladoras. O hipotálamo contém neurônios neuroendócrinos que secretam o hormônio liberador de corticotrofina (CRH), também denominado de fator liberador de corticotrofina (CRF), este estimula a glândula pituitária a produzir e liberar o hormônio adrenocorticotrófico ou adrenocorticotropina (ACTH) na circulação (DEMORROW, 2018). O ACTH então estimula a glândula adrenal a sintetizar e liberar corticosteroides como o cortisol em humanos e a corticosterona em roedores (NEVES, 2015). A ação dos glicocorticoides regula ativação do eixo HPA, por inibição da liberação de CRH e ACTH e consequentemente reduzindo a liberação de glicocorticoides. No entanto o aumento excessivo dos níveis de cortisol ou corticosterona torna o eixo hiper-reativo, o qual contribui para os sintomas prevalentes na depressão (DE ARAÚJO et al., 2018; O'CONNOR et al., 2017).

Figura 2-Representação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal.



Fonte: Adaptado de Nestler et al, 2002. Neurônios do núcleo paraventricular (PVN), fator liberador de corticotrofina (CRF), adrenocorticotropina (ACTH).

Os receptores glicocorticoides (GR) desempenham um papel fundamental na regulação do feedback do eixo HPA, o qual é expresso em todo o cérebro e em maior quantidade no córtex pré-frontal e hipocampo, regiões responsivas ao estresse com variação no nível de expressão e consequentemente na resposta a ativação dos GR (MADALENA; LERCH, 2017; MCEWEN; NASCA; GRAY, 2016; VAN BODEGOM; HOMBERG; HENCKENS, 2017).

Os GR funcionam como um fator de transcrição dependente de hormônios, a ligação de glicocorticoides provoca alterações conformacionais no receptor que ativa domínios funcionais relevantes para associar-se a genes específicos de resposta aos glicocorticoides (WEIKUM et al., 2017).

Uma outra região do cérebro importante na resposta ao estresse é a amígdala, pois processa informações reconhecendo estímulos de medo e ansiedade, importantes para alertar

sobre um potencial perigo (SHARP, 2017). Duas regiões da amígdala estão particularmente envolvidas no processamento da ansiedade, amígdala basolateral (BLA) e a amígdala central (CeA) (BABAEV; CHATAIN; KRUEGER-BURG, 2018).

A BLA se comunica com regiões do cérebro que afetam a cognição, motivação e as respostas ao estresse, como córtex pré-frontal, hipocampo, nucleus accumbens (SHARP, 2017), além de, exercer controle do eixo HPA por meio de conexões diretas e indiretas com o núcleo paraventricular inibitório do hipotálamo e liberar CRF para o hipotálamo anterior ativando as células corticotróficas para liberar ACTH (TRIPATHI et al., 2019).

O estresse e os níveis elevados de glicocorticoides também aumentam a expressão de genes que codificam o hormônio CRH no núcleo amigdalóide central e consequentemente aumenta a reatividade do eixo HPA (HERMAN et al., 2016).

2.4 Modelo animal de depressão induzida por dexametasona

Modelos animais na psicofarmacologia, auxiliam na busca da compreensão da fisiopatologia e de novas alternativas farmacológicas para o tratamento dos transtornos mentais (MCGONIGLE, 2014).

A maioria dos modelos animais de depressão respeitam critérios de validade, dentre os quais, três são de maior relevância, a validade de construto, na qual está relacionada a habilidade do modelo reproduzir aspectos fisiológicos do transtorno, a validade aparente ou de face que corresponde às semelhanças dos sintomas entre o modelo e a condição clínica e a validade preditiva, que diz respeito à propriedade pela qual o modelo apresenta capacidade de resposta aos agentes terapêuticos (NUNES; HALLAK, 2014).

O modelo de depressão induzida por dexametasona, consiste em expor os animais a uma condição de altos níveis de glicocorticóides para simular uma situação de estresse crônico, resultando em uma desregulação do eixo HPA (PLANCHEZ; SURGET; BELZUNG, 2019).

De acordo com estudos recentes, a administração aguda e repetida de glicocorticoides em animais reproduz uma sintomatologia similar à da depressão através da disfunção do eixo HPA e da alteração do controle de feedback negativo (CRUPI et al., 2010; LEE et al., 2009; STERNER; KALYNCHUK, 2010).

Estudos tem demonstrado que a administração única ou repetida de dexametasona induz comportamento tipo depressivo, avaliado em testes comportamentais de nado forçado e preferência por sacarose (SKUPIO *et al.*, 2015; WRÓBEL *et al.*, 2014).

O tratamento crônico com corticosterona pode provocar alterações fisiológicas e comportamentais semelhantes àquelas observadas em pacientes com TDM, como anedonia ilustrada pela diminuição da preferência por sacarose em camundongos (GOURLEY; WU; TAYLOR, 2008), comportamento semelhante a depressão e ansiedade por camundongos, nos testes de nado forçado e campo aberto (DAVID *et al.*, 2009).

É sabido que a dexametasona em testes não-clínicos pode contribuir para uma série de alterações comportamentais, como comportamentos do tipo ansioso e depressivo (JIANG *et al.*, 2021; SKUPIO *et al.*, 2015).

O tratamento com corticosteroides a curto e longo prazo, frequentemente está associado a complicações neuropsiquiátricas como depressão, irritabilidade, insônia e ansiedade (THBAUT, 2019).

Nagano *et al* (2012) mostrou que a exposição de ratos à dexametasona, pode levar a anormalidades no sistema serotoninérgico no córtex pré-frontal medial (mPFC) e redução nos níveis de serotonina no hipocampo. Além disso, dependendo da concentração, a dexametasona pode induzir liberação aumentada de glutamato, causando toxicidade neuronal (IOANNOU *et al.*, 2003).

2.5 Estresse Oxidativo

O estresse oxidativo é um processo biológico complexo, que resulta de um desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes em favor dos oxidantes, levando a uma interrupção da sinalização redox e controle e/ou dano molecular, ocorre quando um organismo não é capaz de desintoxicar ou reparar efetivamente os efeitos prejudiciais dos radicais livres (GUTTERIDGE; HALLIWELL, 2018; STEENKAMP *et al.*, 2017).

Os processos redox (oxidação-redução) permeiam praticamente todos os processos fundamentais, desde a bioenergética ao metabolismo e funções vitais do organismo. Nesses processos são produzidas espécies reativas de oxigênio (EROs) como o peróxido de hidrogênio (H₂O₂), superóxido, radical hidroxila (OH), além de espécies reativas de nitrogênio (RNS)

como o óxido nítrico (NO), dióxido de nitrogênio (NO₂), peroxinitrito (ONOO⁻), nitrito/nitrato entre outros (SIES; BERNDT; JONES, 2017).

O NO está envolvido em diversas funções fisiológicas, como transmissão neural, relaxamento do músculo liso, imunomodulação, dilatação dos vasos sanguíneos (BHATT; NAGAPPA; PATIL, 2020), no entanto em níveis elevados podem causar modificações nos lipídeos de membranas, alterar funções de receptores, enzimas e genes (VAVÁKOVÁ; URAČKOVÁ; TREBATICKÁ, 2015).

Estudos sugerem que o NO apresenta efeitos diversos no SNC, sendo que baixas concentrações de NO são neuroprotetoras, enquanto concentrações elevadas medeiam ações neuroinflamatórias e neurotóxicas, sendo correlacionada fortemente com a fisiopatologia de muitos transtornos neuropsiquiátricos como TDM e TAG (transtorno de ansiedade generalizada) (KUDLOW et al., 2016).

Nossas células são privilegiadas com um mecanismo de defesa antioxidante, importantes na proteção e redução dos danos provocados por espécies reativas de EROs e ERN. Esse sistema de defesa é composto por antioxidantes enzimáticos, os quais compreendem superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) glutationala peroxidase (GPx), glutationala redutase (GR) e glutationala S transferase (GST) e antioxidantes não enzimáticos que incluem glutationala reduzida (GSH), vitamina C (ácido ascórbico), vitamina E (α -tocoferol), N-acetil-cisteína (NAC), ácido úrico, carotenoides, flavonoides, ubiquinol entre outros (PANDYA; HOWELL; PILLAI, 2013; DE OLIVEIRA-SILVA et al., 2019).

A integridade do cérebro é vital para o funcionamento normal do SNC, o mesmo é extremamente sensível ao dano oxidativo, pois consome uma quantidade elevada de oxigênio (cerca de 20%), além disso, as membranas neuronais são ricas em ácidos graxos poli-insaturados, como ácido araquidônico, ácido docosahexaenóico e ácido eicosapentaenóico, que são vulneráveis ao estresse oxidativo (SALIM, 2017; SHICHIRI, 2014).

O aumento de ERO e ERN e a redução da capacidade antioxidante leva a deterioração oxidativa dos lipídios poli-insaturados de membrana, tendo como produto secundário o malondialdeído (MDA), considerado biomarcador de dano a membrana celular (GROTTO et al., 2009).

A gravidade da depressão e do transtorno de ansiedade, está correlacionada com aumento de marcadores de estresse oxidativo como (MDA), glutationala oxidada (GSSG) e redução de

antioxidantes como a glutathione reduzida (GSH) (BLACK et al., 2015; PALTA et al., 2014; STEENKAMP et al., 2017).

Considerar o dano oxidativo e a resposta do sistema antioxidante (glutathione) no SNC, pode ser uma boa abordagem para a descoberta de fármacos com potencial antioxidante na perspectiva de reverter os sintomas prevalentes no TDM (GIBSON; KORADE; SHELTON, 2012).

2.6 Abordagem farmacológica

Os antidepressivos usados clinicamente são medicamentos que auxiliam na redução dos sintomas depressivos, por meio de mecanismos que aumentam a concentração de neurotransmissores monoaminérgicos (serotonina, noradrenalina e/ou dopamina), com ações farmacológicas que envolvem o bloqueio da recaptação e ou receptores monoaminérgicos, inibição da enzima monoamina oxidase e o bloqueio do receptor NMDA-glutamatergico (FASIPE et al., 2018; KHUSHBOO; SHARMA, 2017).

Até a década de 1980, o tratamento farmacológico da depressão era limitado aos antidepressivos de primeira geração, dentre os quais estão antidepressivos tricíclicos (ADTs) como a imipramina, descoberta em 1958 e os inibidores da monoamina oxidase (IMAO) (FURUKAWA et al., 2016).

Os ADTs bloqueiam a recaptação de serotonina e noradrenalina nos terminais pré-sinápticos, o que leva ao aumento da concentração desses neurotransmissores na fenda sináptica, resultando em um efeito antidepressivo eficaz (MORACZEWSKI; AEDMA, 2020). Estudo realizado por Harvey et al (2006) com ratos mostrou que a imipramina pode bloquear os receptores 5HT_{2A/C} e NMDA e consequentemente reduzir a atividade da NOSn.

No entanto, os ADTs também compartilham outras ações farmacológicas indesejáveis, pois são antagonistas competitivos dos receptores pós-sinápticos alfa colinérgicos (alfa1 e alfa2), muscarínicos (GÜLOĞLU et al., 2011) e histaminérgicos (H₁) (HALL; ÖGREN., 1984), o que pode contribuir para alguns efeitos indesejados como tontura, sonolência, redução da pressão arterial (receptores alfa1), visão turva, constipação, confusão, retenção urinária e taquicardia (receptores muscarínicos), além de sedação, aumento do apetite, ganho de peso associado ao bloqueio dos receptores H₁ (MORACZEWSKI; AEDMA, 2020), além de serem

potencialmente letais em alta dosagem (CLEARE et al., 2015; MAGGIONI et al., 2008). Assim como os ADTs, os inibidores de monoamina oxidase (IMAO), apresentam o pior perfil de efeitos colaterais de todos os antidepressivos (FARACH et al., 2012).

Na segunda classe, encontram-se os inibidores seletivos da recaptação da serotonina (ISRS) que são mais toleráveis e eficientes, em uma ampla gama de transtornos psiquiátricos, depressão, ansiedade e transtornos alimentares (HERPERTZ et al., 2011;BANDELOW; MICHAELIS; WEDEKIND,2017).

O alvo dos ISRSs é o transportador de serotonina (5-HTT), responsável pela recaptação da serotonina e encontra-se localizado na membrana plasmática de neurônios serotoninérgicos. Estes, enviam seus axônios por todo o cérebro, sendo responsáveis por controlar vários processos cerebrais, incluindo a emoção, a alimentação, o sono, o comportamento sexual e a percepção sensorial (OLIVIER et al., 2011). O mecanismo de ação dos ISRSs como a fluoxetina acontece através do bloqueio da recaptação da serotonina no terminal pré-sináptico, aumentando assim os níveis de 5-HT na fenda sináptica (FARACH et al., 2012).

Apesar da eficácia no tratamento, esses também podem apresentar alguns efeitos colaterais como: aumento inicial do nervosismo, insônia, náuseas e disfunção sexual, além disso quando interrompidos, podem causar tonturas e sintomas similar a gripe (GARTLEHNER et al., 2011).

Outra classe de fármacos são os inibidores da recaptação da serotonina-noradrenalina (IRSN), dos quais os mais utilizados são a duloxetina e venlafaxina, que apresentaram eficácia no tratamento de ansiedade, porém são menos toleráveis que os ISRS (BALDWIN et al., 2014). Além disso, o tratamento está associado com o aumento da pressão arterial e risco de desenvolver disfunção hepática (BLEAKLEY; DAVIES et al., 2014).

Os inibidores da recaptação de noradrenalina e dopamina bupropiona atuam inibindo a recaptação da noradrenalina e dopamina. A bupropiona é um antidepressivo que pode ser uma alternativa para pacientes que não respondem ou não toleram os ISRS e IRSN, pois mostra um perfil favorável de tolerabilidade, no entanto em alguns casos podem apresentar efeitos colaterais que incluem náuseas, insônia, sudorese e ansiedade (DELL'OSSO et al., 2011).

Os inibidores seletivos da recaptação de noradrenalina (IRNs) como reboxetina e atomoxina inibem seletivamente os transportadores de recaptação de noradrenalina (NET) localizados nas membranas pré-sinápticas nos terminais noradrenérgicos, aumentando os níveis

de noradrenalina dentro das fendas sinápticas (FASIPE, 2019). No entanto, foi sugerido que são menos eficazes que outros antidepressivos, além de apresentar alguns efeitos colaterais como perda de apetite, náusea, agitação, insônia, tontura, constipação, fadiga, boca seca, sedação, sudorese e palpitações e hipertensão (MATTHEWS; HORDER; PEARCE.2018).

Antagonistas dos receptores 5-HT₂ incluem trazodona e nefazodona, tem como principal efeito farmacológico o antagonismo dos receptores pós-sináptico 5HT_{2A/C} e o bloqueio da recaptação da serotonina em algum grau (SCHATZBERG; DEBATTISTA, 2017).

Uma outra classe de antidepressivos são os antagonistas dos receptores alfa-2-adrenérgicos (α_2) que modulam a função dos receptores 5-HT₂ e 5-HT₃, como exemplo temos a mirtazapina, no entanto apresenta alta afinidade para os receptores H₁-histamínicos, o que determina alguns efeitos colaterais como sonolência, ganho de peso e sedação (DELL'OSSO et al., 2011).

Enquanto dentro das classes mais recentes, por exemplo, atuam bloqueando os receptores glutamatérgicos do subtipo NMDA (cetamina), CP-101.606 (traxoprodil), GLYX-13 (rapastinel), NRX-1074 (Apimostinel) e Riluzol. Esses são considerados novos antidepressivos, dentre outros, e a aprovação está em discussão em alguns países (FASIPE, 2019). Assim, para os antidepressivos convencionais disponíveis no mercado, o início tardio da ação terapêutica é um problema na clínica médica, dado o risco de suicídio elevado, com o atraso do tratamento farmacológico (LUO, HE e LIN, 2019). Estudos clínicos relatam que 30% dos pacientes deprimidos, não respondem totalmente ao tratamento e 70% não atingem a completa remissão (KULKARNI e DHIR, 2009).

A respeito do tratamento dos transtornos de ansiedade, são utilizados os benzodiazepínicos, como por exemplo o flurazepam, clonazepam, diazepam, alprazolam e lorazepam. Esses atuam potencializando os efeitos do ácido gama-aminobutírico no SNC, no qual se liga de modo específico a subunidade α do receptor GABA_A, aumentando a afinidade do GABA pelo receptor e consequentemente a frequência de abertura do canal de cloreto, resultando assim, em sedação e consequentemente alívio dos sintomas da ansiedade (BLEAKLEY; DAVIES et al., 2014). No entanto se tornou uma segunda opção no tratamento, uma vez que foi constatado que os inibidores seletivos da recaptação da serotonina (ISRS) são mais toleráveis e eficientes, em uma ampla gama de transtornos psiquiátricos, depressão, ansiedade e transtorno alimentares (HERPERTZ et al., 2011;BANDELOW; MICHAELIS; WEDEKIND,2017).

Apesar dos grandes avanços na compreensão da neurobiologia do TDM, a sua fisiopatologia, assim como da ansiedade não está totalmente elucidada, nenhum dos mecanismos estabelecidos explica todos os aspectos da patologia (OTTE et al, 2016), dificultando a eficácia dos tratamentos disponíveis, justificando assim a realização novos estudos, principalmente com substâncias isoladas de óleo essencial de plantas medicinais.

As plantas medicinais são usadas popularmente há muitos anos, para o tratamento de doenças físicas ou mentais. Estudos científicos têm revelado um grande potencial de constituintes de óleos essenciais presentes em plantas com atividade antidepressiva e ansiolítica (DE SOUSA, 2017).

2.7 Plantas medicinais

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS) mais de 80% da população em países desenvolvidos e subdesenvolvidos, utilizam plantas medicinais para cura de doenças e promoção a saúde (SASIDHARAN et al., 2011), considerando o contexto histórico e sua importância na medicina tradicional, logo surgiu a necessidade de validação científica, principalmente das propriedades farmacológicas e toxicológicas (FIRMO et al., 2011).

Plantas medicinais tem sido alvo de estudos não-clínicos *in vitro* e *in vivo* em diversas áreas de conhecimento e em especial na psicofarmacologia, com intuito de contribuir para a produção de fitoterápicos e na descoberta de novos fármacos psicoativos com ação no SNC (SARRIS et al., 2011).

As plantas medicinais aromáticas, são conhecidas por produzirem metabólitos secundários, compostos orgânicos que são acumulados durante o metabolismo, no qual são importante para as interações da planta com o seu ambiente, como proteção contra patógenos, além de atrativos para polinizadores (GANDHI; MAHAJAN; BEDI, 2015).

Esses metabólitos bioativos, são os responsáveis pelos efeitos farmacológicos eficazes no tratamento de várias doenças, incluindo depressão e transtorno de ansiedade além de apresentarem uma considerável redução em efeitos colaterais (BAHMANI et al., 2014).

Dentre os metabólitos secundários mais bem estudados, estão os constituintes dos óleos essenciais que têm sido de extrema importância para a descoberta de novas moléculas com atividade biológica relevante para a indústria farmacêutica.

2.7.1 Óleos essenciais e seus componentes químicos

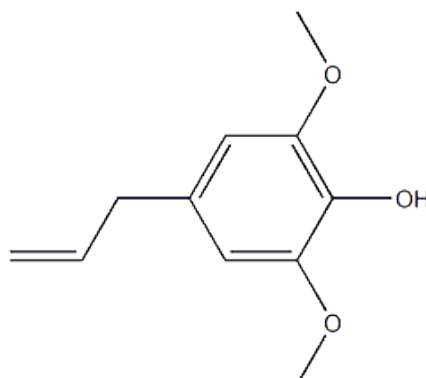
Óleos essenciais são líquidos hidrofóbicos de compostos aromáticos e voláteis, presentes em várias partes de plantas medicinais e aromáticas, como folha, semente e raiz constituído por metabólitos secundários, terpenóides, compostos alcóolicos, ácidos, aldeídos, corpos cetônicos e fenóis, os quais são importantes para a defesa da planta (HYLDGAARD; MYGIND; MEYER, 2012; PANDEY et al., 2017).

Os óleos essenciais têm uma ampla aplicação na indústria farmacêutica, devido sua vasta ação farmacológica como antibacteriana, antifúngica, antiviral, anti-inflamatória, antitumoral, antioxidante, ansiolítica e antidepressiva, além de sua relevância na indústria cosmética e alimentícia (ALI et al., 2015b; KUMARI et al., 2014).

Os óleos essenciais apresentam cerca de 20 a 60 diferentes componentes bioativos, no entanto 2 a 3 substâncias estão presentes em alta concentração, dentre os quais estão os terpenos, sintetizados no interior da célula por uma via dependente do mevalonato e constituídos por unidades de isopreno e os fenilpropanoides, que são oxidados em uma cadeia alifática ou anel aromático (CARVALHO et al., 2014; OPITZ; NES; GERSHENZON, 2014; SWAMY; AKHTAR; SINNIHA, 2016).

2.7.2. 4-alil-2,6-dimetoxifenol

O 4-alil-2,6-dimetoxifenol (ADMP) (Figura 3) é um composto da classe dos fenóis: um fenilpropanoide, no qual o fenol é substituído por um grupo alil na posição 4 e grupos metoxi nas posições 2 e 6, respectivamente, também pode ser conhecido como metoxieugenol, 4-alilsiringol, fenol 2,6 dimetoxi -4- (2-propenil) 2,6-dimetoxi-4-prop-2 enilfenol, 2,6 dimethoxychavicol, 2,6 dimetoxi-4-alilfenol e 4-hidroxi-3,5 dimetoxialilbenzeno com fórmula molecular $C_{11}H_{14}O_3$ e peso molecular 194,23 g/mol (CHEBI, 2016).

Figura 3- Estrutura bidimensional do ADMP

Fonte: Chemicalbook

O ADMP é um composto fenólico que pode ser encontrado em especiarias e ervas como *Myristica fragrans* (noz-moscada) (LÓPEZ et al., 2015), no óleo essencial do caule de *Myrica esculenta* (AGNIHOTRI; WAKODE; ALI, 2012); na raiz de *Sassafras albidum* (sassafrás) (KAMDEM; GAGE, 1995) e *Fagopyrum esculentum* (KALINOVA; TRISKA; VRCHOTOVA, 2011).

Apesar de seu uso na indústria de alimentos como agente aromatizante (EFSA, 2011), sua atividade biológica é pouco conhecida, alguns estudos com o extrato de *Myristica fragrans* apresentaram atividades anti-helmíntica (LÓPEZ et al., 2015), antimicrobiana, anti-inflamatória (AGNIHOTRI; WAKODE; ALI, 2012) e antitumoral (THUONG et al., 2014).

Em um estudo *in vitro* realizado por Maeda e colaboradores (2008), o ADMP mostrou alta atividade antioxidante, em análise da atividade da superóxido dismutase e no teste do tiocianato férrico. Entretanto, não existem estudos com uma possível atividade farmacológica no sistema nervoso central.

3. RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA

Situações estressantes da vida diária de forma repetida e/ou prolongada, tem como consequência, o estresse oxidativo pelo aumento de NO que resulta na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e espécies reativas de nitrogênio (ERN), que por sua vez podem levar a ativação prolongada do eixo HPA pela regulação negativa dos receptores de glicocorticoides (GR), resultando em aumento do hormônio liberador de corticotropina (CRH), contribuindo assim, para os sintomas presentes nos transtornos psiquiátricos e neurológicos incluindo a depressão e o transtorno de ansiedade (CHEN et al., 2015; ORMONDE DO CARMO et al., 2015; VIOLI; PIGNATELLI, 2014).

Considerando, o alto grau de comorbidades, prevalência de alto índice dos transtornos de depressão e ansiedade em países desenvolvidos e subdesenvolvidos, é relevante a necessidade de ampliar as opções terapêuticas, tendo em vista que alguns pacientes são resistentes aos fármacos disponíveis, além de alguns medicamentos apresentarem efeitos colaterais indesejáveis. Considerando que os processos etiológicos da depressão e ansiedade compartilham semelhanças (NEWBY et al., 2015), novas abordagens terapêuticas são necessárias, e um boa alternativa é a utilização de produtos naturais.

Os fenilpropanóides são um dos principais componentes dos óleos essenciais de plantas e possuem uma ampla gama de atividades biológicas, como antimicrobiana, anti-inflamatória, anticancerígena, antioxidante, analgésica, antiplaquetária, antidepressiva e ansiolítica (ILJEVA; BUCHBAUER, 2016).

O 4-alil-2,6-dimetoxifenol é um fenilpropanoide e apresentou atividade antioxidante (OGATA et al., 1997), além de apresentar estrutura similar com outros fenilpropanóides, como o metilisoeugenol e o eugenol que apresentaram atividade antidepressiva e ansiolítica (FAJEMIROYE et al., 2014; IRIE et al., 2004) em modelos animais de depressão e ansiedade em camundongos.

Desta forma, os estudos *in silico* e não-clínicos *in vivo* com fenilpropanóides, como o 4-alil-2,6-dimetoxifenol apresentam uma grande relevância, pois podem elucidar suas propriedades farmacológicas e seu mecanismo de ação, contribuindo assim para a descoberta de novas possibilidades farmacológicas para o tratamento do TDM e/ou ansiedade.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Investigar a ação do 4-alil-2,6-dimetoxifenol (ADMP) no SNC por meio de estudos *in silico* e *in vivo* com o intuito de verificar os possíveis efeitos antidepressivos e ansiolíticos em modelos animais de depressão-símile induzidos por dexametasona e seus possíveis mecanismos de ação.

4.2 Objetivos Específicos

- Realizar estudos *in silico* de docking molecular e predisposição dos riscos de toxicidade do ADMP;
- Efetuar a triagem farmacológica comportamental e determinação da dose letal 50% do ADMP;
- Verificar se o ADMP altera a atividade locomotora dos camundongos por meio do teste de campo aberto;
- Induzir o comportamento depressivo-símile por meio da administração aguda de dexametasona em camundongos;
- Investigar a atividade antidepressiva do ADMP nos modelos experimentais de nado forçado e suspensão da cauda;
- Avaliar a atividade ansiolítica do ADMP através do teste do labirinto em cruz elevado e do campo aberto;
- Investigar o mecanismo de ação do ADMP através da participação do receptor NMDA e moduladores da via do óxido nítrico em camundongos submetidos ao modelo do nado forçado;
- Avaliar os parâmetros de estresse oxidativo (GSH) no córtex pré-frontal de camundongos submetidos ao modelo do nado forçado.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Locais da Pesquisa

As atividades de pesquisa foram desenvolvidas no Laboratório de Psicofarmacologia (PSIFARM) e no Laboratório de Quimioinformática, com a colaboração dos professores Dr. Marcus Tullius Scotti e Dra. Luciana Scotti. Ambos os laboratórios situados no Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos (IPeFarM) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB).

5.2 Material

5.2.1 Substâncias

- O 4-alil-2,6-Dimetoxifenol (ADMP) utilizado nos testes comportamentais é um derivado sintético do eugenol (MUNIZ et al., 2021), cedido pelo professor Dr. José Maria Barbosa Filho, responsável pelo Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, localizado na Universidade Federal da Paraíba-UFPB.
- Azul de metileno 10 mg/kg-Sigma Aldrich (EUA);
- Cloridrato de dextrocetamina (1mg/kg) - Cristália (Brasil);
- Dexametasona (64µg/kg) - Merck (Brasil)
- Diazepam 1 mg/kg- Cristália (Brasil);
- Imipramina 10 mg/ kg- Merck (Brasil);
- L-arginina (750 mg/kg);
- L-Name 10 mg/kg-Sigma Aldrich (EUA);
- Solução de Tween 80 a 5 % (Polissorbato 80) – Vetec (Brasil);
- Solução salina (NaCl a 0,9 %) - Merck (Brasil).

As doses e períodos de administração das drogas foram estabelecidas de acordo com a literatura e protocolo experimental já padronizado no laboratório (CAVALCANTE, 2018; ARAÚJO, 2018).

Quanto a preparação das drogas, antes de sua utilização foram dissolvidas em solução de cloreto de sódio quando solúveis em água (azul de metileno, cloridrato de dextrocetamina, diazepam, imipramina, L-arginina) e no caso de substâncias insolúveis em água, estas foram dissolvidas na solução de Tween 80 (ADMP e L-NAME).

5.3.1 Animais

Para a realização da triagem farmacológica e subsequentes experimentos foram utilizados Camundongos (*Mus musculus*) Swiss, albinos, adultos, machos, com peso entre 25-30g, com aproximadamente 2-3 meses de idade. Os animais foram provenientes da Unidade de Produção Animal (UPA) do Instituto de Pesquisa de Fármacos e Medicamentos (IPeFarM) da Universidade Federal da Paraíba.

No Biotério, os animais foram alojados em gaiolas de polietileno, mantidos sob condições monitoradas de temperatura equivalente a 21 ± 2 °C, com livre acesso a uma dieta controlada a base de ração tipo pellets e água disponível em garrafas de polietileno com bicos de inox, encaixadas na parte superior da grade metálica da gaiola. Os animais também foram mantidos em ciclos claro/escuro de 12 horas, sendo a fase clara das 6h00 às 18h00 horas e pesados antes da realização dos testes.

5.3.2 Condições experimentais

Toda a parte experimental foi desenvolvida no Laboratório de Psicofarmacologia - PSIFARM na Universidade Federal da Paraíba (UFPB).

No ambiente de experimentação no PSIFARM, os animais foram previamente alojados em outras gaiolas de polietileno, com pelo menos 12 h de antecedência a execução dos testes, visando assim minimizar as possíveis alterações comportamentais e permitir uma adaptação ao novo ambiente.

Os animais foram mantidos a temperaturas de 21 ± 2 °C e privados de água e ração 30 min antes dos testes, os quais foram realizados no período compreendido entre 8h00 às 12h00, sendo os mesmos utilizados apenas uma única vez e em seguida eutanasiados.

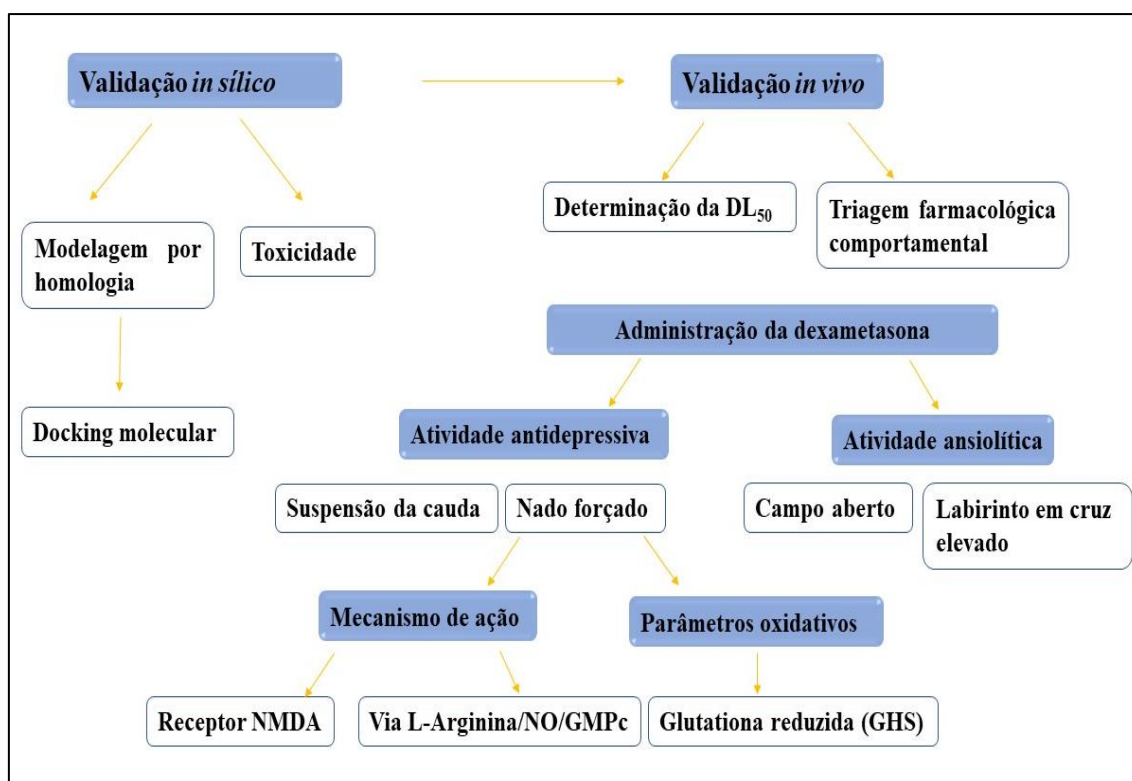
5.3 Aspectos éticos

Os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com as recomendações da Lei 11.794 de 08/10/2009, Lei Arouca, e o projeto foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal da Paraíba sob a certidão CEUA de número 2109260819.

5.4 Método

As metodologias executadas no estudo da atividade antidepressiva e ansiolítica-símile em camundongos estão representadas na Figura 4.

Figura 4- Resumo esquemático das metodologias utilizadas no estudo do ADMP.



5.5 Validação *in silico*

O estudo *in silico* de possíveis alvos terapêuticos é uma alternativa necessária antes de procedimentos experimentais *in vivo*, uma vez que permite uma rápida análise e compreensão dos possíveis mecanismos moleculares envolvidos na atividade farmacológica e consequentemente reduz gastos no processo da descoberta de novos agentes bioativos (BALAKRISHNAN; RAJ; KANDAKATLA, 2015).

5.5.1 Modelagem por homologia

5.5.1.1 Identificação da sequência alvo e seleção da proteína -modelo

A sequência alvo foi obtida no banco de dados do National Center for Biotechnology Information (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>) com sequências de aminoácidos no formato FASTA.

A pesquisa do modelo foi realizada com a ajuda do BLAST e HHBlits e realizada na biblioteca de modelos SWISS-MODEL (SMTL, atualização mais recente: 04-04-2018, versão mais recente do PDB incluída: 29-03-2018). Para cada molde identificado, a qualidade foi prevista a partir de recursos de alinhamento, como ProMod3, QMEAN e GMQE. O modelo com a mais alta qualidade e identidade (63,14%) com a sequência alvo foi o receptor 2C 5-hidroxitriptamina.

5.5.1.2 Construção e validação do modelo

O modelo de receptor humano 2-hidroxitriptamina (serotonina) 2A foi construído usando o método de modelagem por homologia molecular usando o servidor SWISS-MODEL.

A qualidade estereoquímica do modelo foi avaliada por PROCHECK (LASKOWSKI et al, 1993) que avalia vários parâmetros estereoquímicos, como ângulos torcionais da cadeia principal, ângulos torcionais da cadeia lateral, contatos fracos ou impedimentos estéricos, planaridade, entre outros. PROCHECK gera o gráfico Ramachandran (ALTSCHUL et al.,

1990), que verifica as regiões permitidas e não permitidas do backbone de aminoácidos. A qualidade estrutural foi avaliada no WHAT IF (<http://swift.cmbi.ru.nl/servers/html/index.html>), que analisa vários parâmetros estruturais, como contatos atômicos entre resíduos.

5.5.2 Docking Molecular

Em princípio, a estrutura tridimensional dos compostos alvo do estudo foi obtido através do banco de dados PubChem e o RCSB PDB (<http://www.wwpdb.org/>) (BERMAN, HENRICK e NAKAMURA, 2003) no formato PDB, o qual fornece informações topológicas para pequenas moléculas para as simulações de dinâmica e modelagem molecular como em estudos de ancoragem (SCHÜTTELKOPF; VAN AALTEN, 2004).

Testes de docking molecular para verificar as possíveis interações do composto 4-alil-2,6-dimetoxifenol, foram realizados através do software o molegro virtual docker (mvd), v. 6.0.1 (THOMSEN; CHRISTENSEN, 2006), com os parâmetros predefinidos pelo software.

Para o procedimento de acoplamento (ligante-receptor e ligante-enzimas), foi utilizada uma GRID de raio de 15 Å de resolução de 0,30, cobrindo o local do sítio de ligação, definido por um ligante conhecido para cada enzima. O modelo foi gerado para realizar a correspondência com as características esperadas entre o ligante e a enzima, usando o algoritmo de busca heurística que combina evolução diferencial e o ligante cristalográfico como modelo. O algoritmo de previsão de cavidades (Moldock) e a função de pontuação de Moldock foram selecionados para obter os resultados.

O Molegro Virtual Docker é um programa computacional em que permite a obtenção de diferentes conformações espaciais do ligante a proteína (receptor ou enzima) com finalidade de identificar a melhor interação ligante-alvo.

5.5.3 Predisposição dos riscos de toxicidade

As moléculas alvo do estudo foram importadas para o software Osis Data Warris 5.0 (<http://www.openmolecules.org/datawarrior>) (SANDER, et al., 2015) o Data Warris é um programa de inteligência química integrada com vários bancos de dados de estruturas químicas, que permite a previsão de propriedades moleculares, através de análise de similaridade estrutural com conjuntos de compostos que apresentam potencial de toxicidade, assim o programa

consegue detectar o fator de risco de toxidade, com base em quatro parâmetros: mutagenicidade, carcinogenicidade, efeito no sistema reprodutor e irritabilidade na pele.

5.6 Validação *in vivo*

Na psicofarmacologia, o uso de modelos animais é uma estratégia inestimável para análise de causas genéticas, ambientais e farmacológicas que podem apresentar sintomas homólogos a de humanos com determinado distúrbio envolvendo o SNC (BOURIN, 2015). Podendo-se desta maneira investigar os possíveis efeitos e mecanismos de ação de substâncias específicas no SNC.

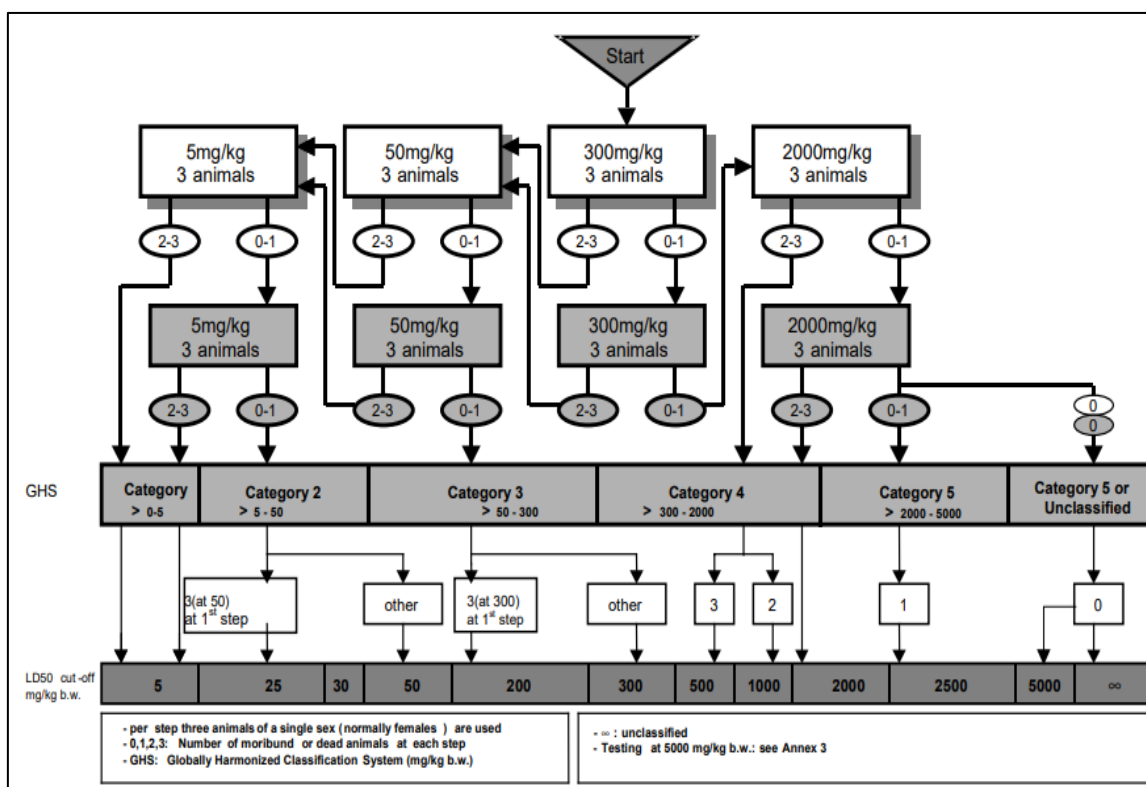
5.6.1 Avaliação geral do 4-alil-2,6-dimetoxifenol no sistema nervoso central e da toxicidade aguda

5.6.1.1 Determinação da DL₅₀

Os estudos de toxicidade aguda *in vivo* são essenciais, para obter informações relevantes a respeito da toxicidade de determinada substância. Uma forma de medir o potencial de toxicidade a um curto prazo, é através da determinação da dose letal mediana (DL₅₀), dose suficiente para matar 50 por cento de uma população de animais testados (ABD ALLAH EISA et al., 2020).

Para a avaliação da toxicidade não clínica aguda e estimativa da DL₅₀, foi utilizada as diretrizes do “*Guideline for Testing of Chemicals*” nº 423/2001 da Organisation for Economic Cooperation and Development (OECD), com algumas modificações (OECD, 2001) (Figura 5).

Figura 5- Protocolo OECD 423. Procedimento de ensaio com dose inicial de 300 mg/kg peso corporal.



Fonte: (OECD 423, 2001)

Os camundongos foram distribuídos em grupos ($n = 3$ fêmeas/ grupo). Ao grupo controle foi administrado apenas o veículo sozinho (solução a 5% (v/v) de Tween 80 em solução salina), enquanto o grupo tratado recebeu uma dose única de ADMP (2000 mg/kg e 300mg/kg), por via intraperitoneal (i.p.).

Com o objetivo de identificar alterações comportamentais nos camundongos, sugestivas de toxicidade e atividade sobre o Sistema Nervoso Central (SNC) ou Sistema Nervoso Autônomo (SNA), como: mudanças na pele e pelos, olhos e membranas mucosas, nos sistemas respiratórios e circulatórios, além de atividade somatomotora e padrão de comportamento, com atenção mais específica para tremores, convulsões, salivação, diarreia, letargia, sono e coma, após administração da substância foram realizadas observações cuidadosas nos primeiros 30 minutos, com atenção especial nas primeiras 4 horas, posteriormente nas primeiras 24 horas, e diariamente por um período de 14 dias.

5.6.1.2 Triagem farmacológica comportamental

A triagem farmacológica comportamental é um teste preliminar para caracterização do efeito de novos fármacos no SNC e sistema nervoso autônomo (SNA), no qual a avaliação é realizada utilizando um protocolo experimental (Figura 6) (ALMEIDA; OLIVEIRA, 2006). O protocolo é recomendado para direcionar o estudo farmacológico, possibilitando a realização de testes mais específicos.

Ao mesmo momento que realizamos a estimativa da DL_{50} , com os mesmos animais realizamos a triagem farmacológica comportamental. O ADMP foi administrado em dose única (300 mg/kg), via i.p, assim os camundongos foram colocados em gaiolas de polietileno para observação dos parâmetros comportamentais, durante um período de quatro horas, nos intervalos de 30, 60, 120, 180 e 240 minutos dos tratamentos iniciais (ALMEIDA; OLIVEIRA, 2006).

Figura 6- Protocolo experimental utilizado na triagem farmacológica comportamental

ATIVIDADE FARMACOLÓGICA	Quantificação dos efeitos (0) sem efeito, (-) efeito diminuído, (+) efeito aumentado, (++) efeito intenso				
	até 30'	1h	2h	3h	4h
1 – SNC					
a – Estimulante					
Hiperatividade					
Iritabilidade					
Agressividade					
Tremores					
Convulsões					
Piloereção					
Movimento intenso das vibrissas					
Outras					
b – Depressora					
Hipnose					
Ptose palpebral					
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					
Limpeza					
Levantar					
Escalar					
Vocalizar					
Sacudir a cabeça					
Contorções abdominais					
Abdução das patas do trem posterior					
Pedalar					
Esteriotípia					
2 - SN AUTÔNOMO					
Diarréia					
Constipação					
Defecação					
Respiração forçada					
Lacrimejamento					
Micção					
Salivação					
Cianose					
Tono muscular					
Força para agarrar					
3 – MORTE					

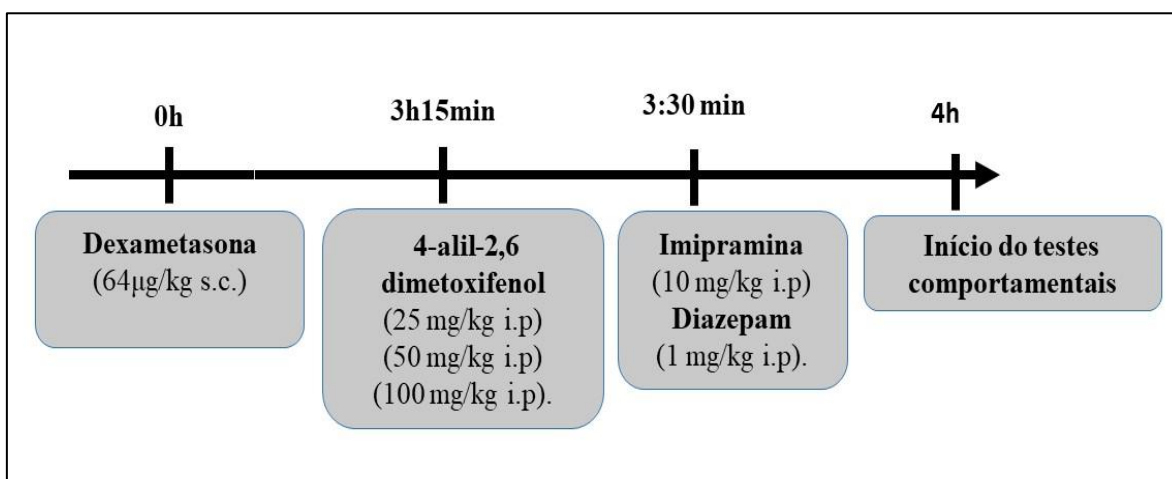
Fonte: ALMEIDA e OLIVEIRA, 2006

5.7 Avaliação da atividade antidepressiva e ansiolítica símile

Para avaliação da atividade antidepressiva e ansiolítica-símile, os animais foram submetidos a indução do comportamento do tipo depressivo e ansioso com a dexametasona, um glicocorticoide sintético.

O protocolo de indução do comportamento depressivo-símile foi adaptado de Wrobél e colaboradores (2014) e utilizado em nosso laboratório (CAVALCANTE, 2018; ARAÚJO, 2018). A dexametasona (64µg/kg) foi administrada por via subcutânea em todos os grupos, com exceção do grupo salina, 4 horas antes da realização dos testes comportamentais (Figura 7). Os experimentos foram concluídos até às 12h00, devido ao pico de liberação de corticosterona endógena.

Figura 7 - Cronograma experimental de indução do comportamento depressivo-símile



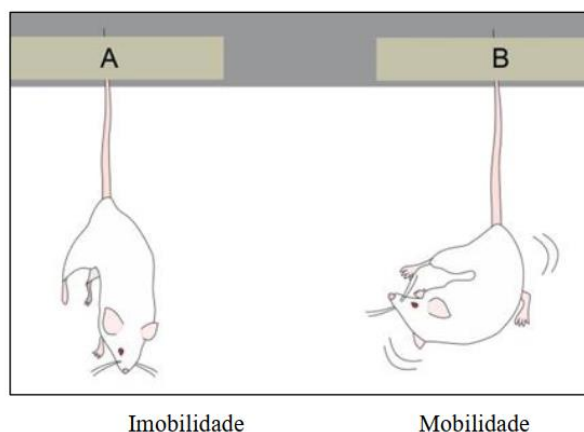
Fonte: CALIXTO, 2021

5.7.1 Teste de suspensão da cauda

O teste de suspensão da cauda foi inicialmente proposto por Steru et al (1985), é um dos modelos mais utilizados para avaliar a atividade antidepressiva de determinada substância em camundongos (ABELAIRA; REUS; QUEVEDO, 2013), que são submetidos ao estresse inescapável e de curto prazo.

O procedimento constitui em suspender o animal pela cauda, com o auxílio de uma fita adesiva acerca de 1 cm do final da cauda (Figura 8), em uma plataforma aproximadamente 50 cm do chão, durante o período de 5 minutos.

Figura 8- Representação dos comportamentos de (A) imobilidade e (B) mobilidade no teste de suspensão da cauda.



Fonte: Adaptado de COLLA, 2015.

Foram utilizados 06 grupos de 8 camundongos (machos) cada, divididos em 03 doses do grupo experimental ADMP (25, 50 ou 100 mg/kg i.p.), controle (salina 0,9%, i.p.), dexametasona (64 µg/kg s.c) e padrão (imipramina 10 mg/kg i.p.), de maneira que cada animal após 30 e 45 minutos dos tratamentos foram suspensos pela cauda durante 5 minutos, avaliando-se os parâmetros comportamentais: latência para imobilidade e o tempo de imobilidade.

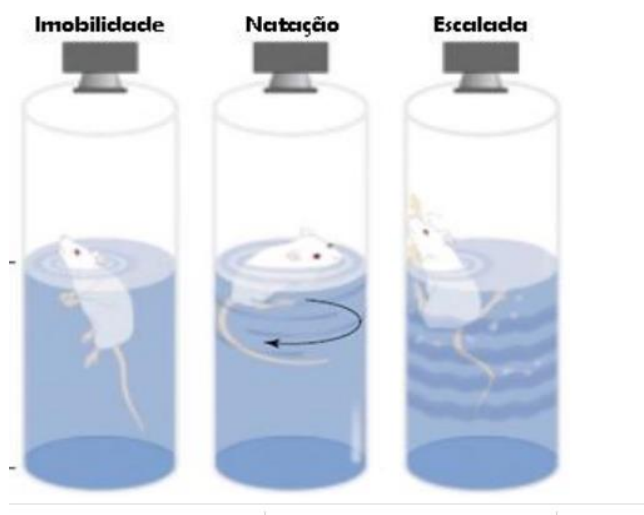
5.7.2 Teste de nado forçado

O teste de nado forçado foi descrito inicialmente Porsolt et al. (1977), é um dos modelos animais comumente utilizados para avaliar substâncias com potencial efeito antidepressivo (SLATTERY; CRYAN, 2012).

Para a realização deste teste foi utilizado cilindros de (25 cm de altura x 12 cm de diâmetro (Figura 9), contendo 2/3 (dois terços) de água mantida a temperatura ambiente entre (23 a 25 °C).

Foram utilizados grupos de 8 camundongos (machos), divididos em 03 doses do grupo experimental ADMP (25, 50, 100 mg/kg i.p.), controle (salina 0,9%, i.p.), dexametasona (64µg/kg s.c.), e padrão (imipramina 10 mg/kg i.p.), de maneira que cada animal após 30 e 45 minutos dos tratamentos foram colocados para nadar no cilindro, no qual a latência e o tempo de imobilidade foram registrados por 5 minutos com a ajuda de um cronômetro.

Figura 9-Representação dos principais comportamentos no teste de nado forçado



Fonte: CRYAN; MARKOU; LUCKI, 2002.

5.7.3 Teste de Labirinto em cruz elevado

O labirinto em cruz elevado (Figura 10) foi um modelo proposto inicialmente por PELLOW et al (1985). Este teste é fundamentado na tendência natural dos roedores em explorar novos ambientes e sua aversão por lugares desprotegidos, brilhantes e elevados, no qual é representado pelos braços abertos (CAMPOS et al., 2013). Assim esse teste é o modelo mais empregado para investigar o comportamento tipo ansioso, uma vez que substâncias ansiolíticas levam o animal a aumentar o número de entradas e o tempo de permanência nos braços abertos (LISTER, 1987).

Figura 10-. Aparelho utilizado no Teste do Labirinto em Cruz Elevada.



Fonte: MORATO, 2006

Os parâmetros experimentais avaliados foram: número de entradas e tempo de permanência nos braços abertos.

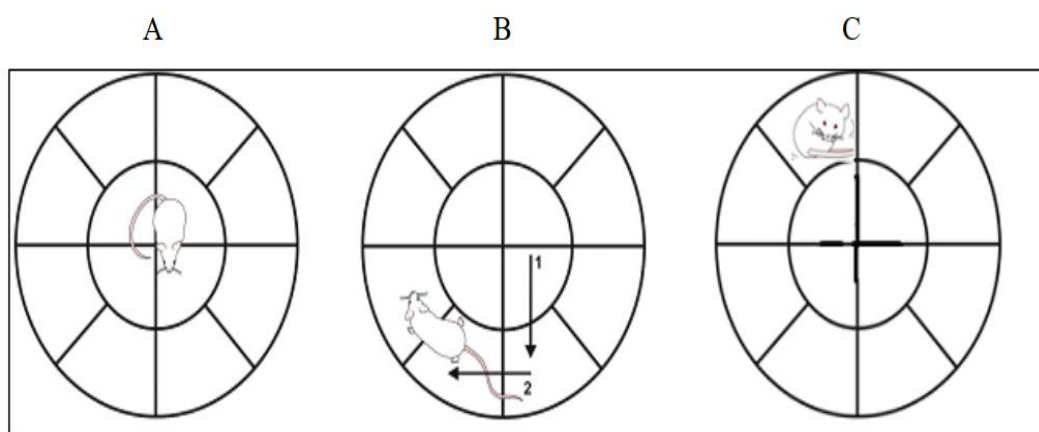
No procedimento experimental desta etapa, foram utilizados seis grupos de seis animais, que receberam os tratamentos: controle (salina 0,9%), dexametasona (64µg/kg), ADMP (25, 50, 100 mg i.p.) e padrão (diazepam 1 mg/kg i.p.) de maneira que cada animal foi submetido individualmente ao aparelho por 5 minutos.

5.7.4 Teste do Campo Aberto

Originalmente descrito por Hall (1930) para testar o efeito de um ambiente estranho sobre o estado emocional de ratos, é um protocolo bastante utilizado para avaliar fármacos ansiolíticos, também podendo ser aplicado para avaliar o efeito de drogas estimulantes, sedativas ou anticonvulsivantes sobre a atividade locomotora espontânea e comportamento exploratório dos animais (Prut & Belzung, 2003).

O aparato do campo aberto consiste em uma arena circular ($40 \times 60 \times 50$ cm), com a base marcada em 12 quadrantes iguais (Figura 11). Foram utilizados grupos de 7-8 camundongos (machos), divididos em 03 doses do grupo experimental ADMP (25, 50, 100 mg/kg i.p.), controle (salina 0,9%, i.p.), dexametasona ($64\mu\text{g/kg}$ s.c.), padrão (diazepam 1 mg/kg i.p.). Após 30 e 45 minutos os animais foram colocados no centro do campo aberto e contabilizados por um período de 5 minutos, observando os seguintes parâmetros: a) Número de cruzamentos; b) Percentual de permanência no centro (tempo no centro/tempo nas extremidades) $\times 100$; c) Número de levantamentos. A base do aparelho foi limpa com solução de álcool 10% após cada teste (ALMEIDA, 2006).

Figura 11-Aparelho utilizado no teste de campo aberto. A) Percentual de permanência no centro. B) Cruzamento de quadrantes. C) Número Rearing (levantamentos).



Fonte: Adaptado de COLLA, 2015

5.8 Investigação do mecanismo de ação

5.8.1 Avaliação da atividade antidepressiva do 4-Alil-2,6-dimetoxifenol (ADMP) em mediadores da via L-Arginina/NO/ GMPc

No intuito de investigar o envolvimento da via NMDA-L-Arginina /NO/GMPc no efeito antidepressivo do 4-alil-2,6-dimetoxifenol, foram utilizadas as substâncias: Cetamina (antagonista do receptor NMDA), L-arginina (precursor do NO), L-NAME (inibidor não específico do óxido nítrico sintetase - NOS) e azul de metileno (inibidor da NOS e da guanilato ciclase solúvel - sGC).

Todos os grupos, exceto o controle (salina 0,9%), receberam o pré-tratamento com dexametasona (64µg/kg s.c.) 4 horas antes da realização dos testes comportamentais (WRÓBEL et al., 2014).

Os grupos experimentais (n=6) foram organizados da seguinte maneira:

- Dexametasona (64µg/kg s.c.);
- L-arginina (750 mg / kg, ip);
- L-name (10 mg/Kg, i.p);
- Azul de metileno (10 mg/kg, ip, dose sub-ativa);
- ADMP (50 mg/kg, ip dose ativa);
- Pré-tratado com ADMP (5 mg /kg, i.p. dose sub-ativa);
- Pré-tratado com L-arginina (750 mg/kg, i.p.) 30 minutos antes da administração do tratamento com ADMP (50 mg/kg i.p. dose ativa);
- Pré-tratados com L-name 30 minutos antes da administração do tratamento com ADMP (5 mg/kg i.p. dose sub-ativa);
- Pré-tratados com azul de metileno 30 minutos antes da administração do tratamento com o 4-alil-2,6 dimetoxifenol (5 mg/kg i.p. dose ineficaz);
- Pré-tratados com Cetamina (1 mg/kg i.p. sub-ativa) 60 minutos antes da administração do tratamento com o 4-alil-2,6 dimetoxifenol (5 mg/kg i.p. dose ineficaz,).

Após 45 minutos do tratamento com o ADMP, os camundongos foram submetidos ao teste de nado forçado (WANG et al., 2019).

5.9 Testes Moleculares

5.9.1 Dissecção das áreas cerebrais

Após os testes comportamentais de nado forçado, os animais foram sacrificados por decapitação e então, as estruturas cerebrais foram dissecadas sobre o gelo. Os córtex pré-frontais foram utilizados para a análise dos parâmetros oxidativos (peroxidação lipídica e glutational).

5.9.2 Determinação de parâmetros de estresse oxidativos

5.9.2.1 Determinação da concentração de glutational reduzida (GSH)

Este teste foi executado de acordo com a metodologia de Sedlak and Lindsay, 1968, baseado na reação do reagente de Ellman (DTNB - 5,5'-Dithiobis (2-nitrobenzoic acid), com os grupos tiois. A área cerebral foi diluída em EDTA 0,02M (10%) e misturada com solução de ácido tricloroacético (50%). Em seguida, as amostras foram centrifugadas (3000 rpm/15min). O sobrenadante foi coletado e misturado com tampão HCl (0,4M; pH 8.9) e DTNB (0,01M). A concentração de GSH (ng de GSH/g tecido) foi determinada por espectrofotometria (412nm).

6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

O resultado da DL_{50} foi demonstrado em percentagem. Os demais resultados, obedeceram a uma distribuição normal de frequência e realizou-se o teste ANOVA (Análise de Variância *one-way*), seguido pelo teste *post hoc* de Tukey's (quando a comparação foi realizada entre três ou mais grupos) ou pelo teste *t* não pareado (quando comparados apenas dois grupos). Os dados foram apresentados em média $\pm$ erro padrão da média (E.P.M.), sendo as diferenças consideradas significantes quando apresentassem $p < 0,05$.

7. RESULTADOS

7.1 Validação *in silico*

7.1.1 Modelagem molecular por homologia

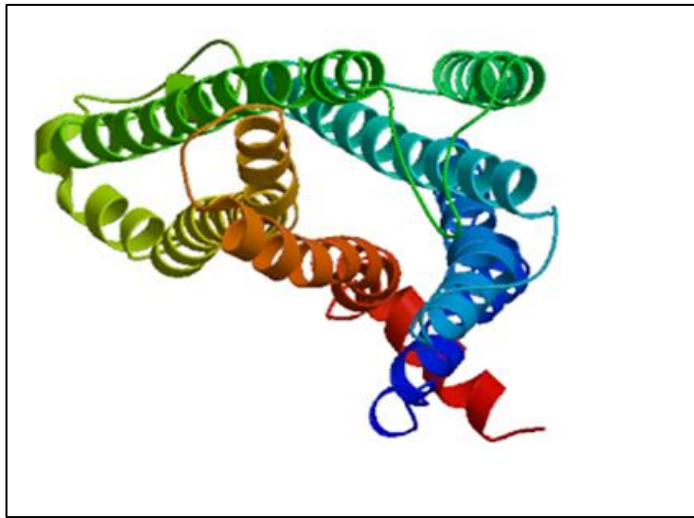
Foi realizada a modelagem molecular do receptor da serotonina (5-HT_{2A}) (receptor 2A da serotonina humana). Um modelo confiável de 5-hidroxitriptamina foi obtido (Figura 12). A confiabilidade e a qualidade estereoquímica da proteína modelada foram validadas. Para isso, foram considerados os dados dos gráficos Ramachandran (Figura 13). A análise do gráfico Ramachandran mostra que as conformações da cadeia principal correspondem a 94% dos resíduos nas regiões mais favorecidas (vermelho), 5,3% permitidos (amarelo) e 0,7% outlier (branco).

É considerado um modelo satisfatório para o gráfico de Ramachandran, modelos que apresentam mais de 90% de aminoácidos na região favorecida. Os pontos pretos representam os aminoácidos e a região vermelha e amarela a estrutura secundária. Neste estudo, apenas dois aminoácidos estavam na região branca, ou seja, proibidos. Portanto, o modelo foi considerado confiável.

Os fatores G, que indicam a qualidade da distância covalente e do ângulo de ligação, foram de 0,31 para diédricos e de 0,42 para phi/psi. Valores positivos ou pouco negativos indicam um modelo de boa qualidade estereoquímica. A qualidade dos contatos atômicos envolvendo os átomos de cada resíduo foi analisada usando o módulo WHAT IF Fine Packing Quality Control, que compara a distribuição das posições dos átomos ao redor de cada resíduo. A pontuação média de todos os resíduos é -0,433. Uma pontuação menor que -5,0 para um resíduo significa contatos atômicos ruins ou incomuns.

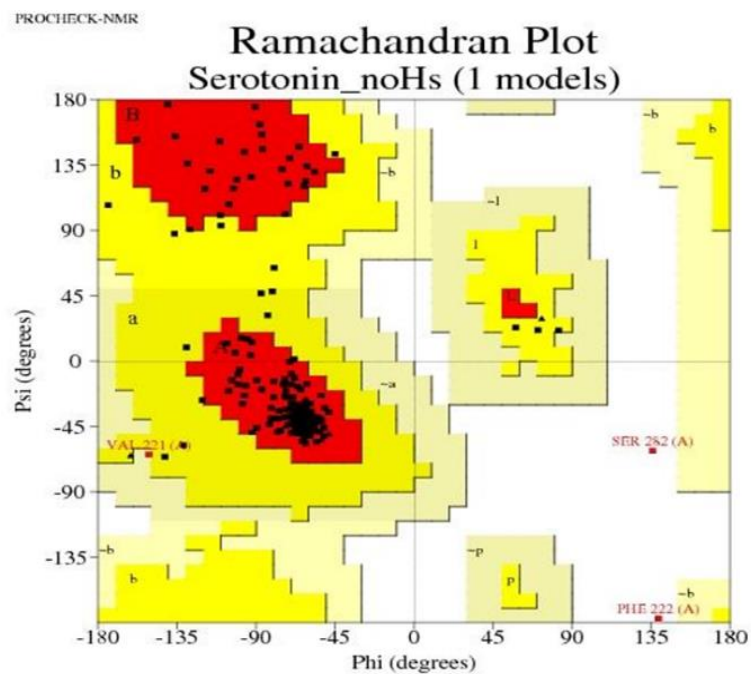
A modelagem de proteínas alvo de medicamentos desempenha um papel fundamental no design de medicamentos, permitindo que métodos computacionais pontuem e classifiquem a afinidade prevista entre medicamentos e alvos, reduzindo os custos de ensaios experimentais de alto rendimento (LIU; TANG; CAPRIOTTI, 2011). A precisão do modelo construído a partir da semelhança de sequência, parâmetros ambientais e a qualidade dos modelos (MUHAMMED; AKI-YALCIN, 2019).

Figura 12- Gráfico de visualização da modelagem do receptor 5HT2A.



Fonte: SWISS-MODEL

Figura 13- Gráfico Ramachandran do modelo validado.



Fonte: PROCHECK

7.1.2 Estudo de docking molecular

7.1.2.1 Avaliação da interação entre o ADMP com o receptor (5 HT_{2A}), mediadores da via L-Arginina/NO/cGMP, TNF- α , IL-6, NMDAr, GR e GABA_A

A estrutura tridimensional (3D) do receptor 5-hidroxitriptamina (5-HT_{2A}) 2A foi adquirida por homologia molecular. Enzimas da guanilato ciclase solúvel (GCs) (PDB ID 3UVJ), enzimas neuronais de óxido nítrico (nNOS) (PDB ID 5UO1) Receptores de glicocorticóides (PDB ID 3H52), receptores de N-metil-D-aspartato (NMDAr) (ID PDB 4PE5), TNF- α (ID PDB 2AZ5), IL-6 (ID PDB 1ALU), receptor GABA_A (PDB ID 6HUO) foram obtidas no Protein Data Bank - PDB. A estrutura 2D de cetanserina (CID: 3822), cetamina (CID_3821), mifepristona (CID: 55245), metotrexato (CID: 126941) azul de metileno (CID: 6099), L-name (CID: 39836), diazepam (CID:3016) e 4-alil-2,6-dimetoxifenol (ADMP) (CID: 226486), foram adquiridos no banco de dados PubChem (SUNGHWAN et al., 2016).

Todas as moléculas de água e cofatores foram eliminadas da estrutura das macromoléculas e compostos, que foram preparados usando os mesmos parâmetros padrão do software. O acoplamento foi realizado usando um MolDock Score (GRID) de 15 Å de raio e 0,30 Å de resolução para cobrir o local de ligação dos ligantes à estrutura da proteína, sendo gerado o modelo. A melhor interação entre ligantes, receptor e enzimas foi avaliada mostrando o mapa 2D do ligante.

Os alvos moleculares e seus respectivos ligantes foram acoplados molecularmente usando o Molegro Virtual Docker (MVD) versão 6.0 (THOMSEN; CHRISTENSEN, 2006). Os resultados foram visualizados através do software MVD e do Discovery Studio 2019 (<https://www.3dsbiovia.com/products/collaborative-science/biovia-discovery-studio/visualization-download.php>).

Como mostrado na Tabela 1, todas as moléculas apresentaram valores negativos do escore de Moldock (energia de ligação), o que é uma indicação de que todas as moléculas têm boa estabilidade quando ligadas ao receptor e enzima.

Para identificar a melhor energia de interação ligante-receptor e resíduos potencialmente envolvidos, os receptores e enzimas foram acoplados ao ADMP, antagonistas e inibidores (Tabela 1, Figura 14,15 e 16).

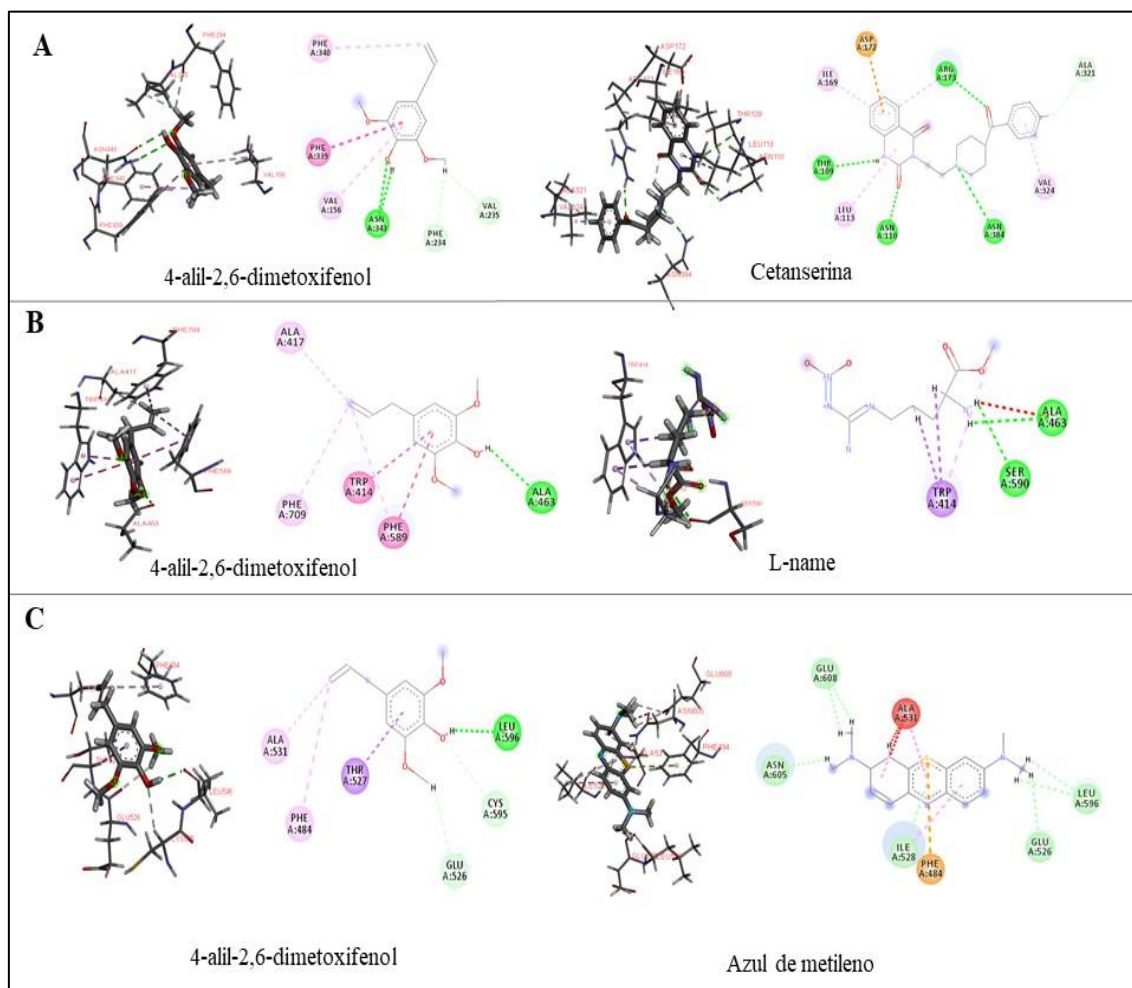
Tabela 1 - Valores de energia obtidos no docking molecular.

Ligantes	Receptor/ enzima /Kcal/mol							GAB _A R
	5-HT _{2A} R	nNOS	GCs	NMDAR	GR	TNF- α	IL-6	
4-alil-2,6-dimetoxifenol (ADMP)	-73.86	-100.82	-71.28	-80,71	-68.15	-71,81	-59.32	-63,95
Antagonista / inibidor benzodiazepínico	-94.50	-91.43	-91.49	-87,35	- 131.10	-97.14	-86.21	-84,45

Fonte: CALIXTO, 2021.

Legenda: 5- HT_{2A}R-Receptor de serotonina 2A; nNOS- óxido nítrico sintase neuronal; GCs- guanilato ciclase solúvel; NMDAR-receptor N-metil-D-aspartato; GR- receptores glicocorticoides; TNF- α - fator de necrose tumoral alfa; IL-6- interleucina-6; GABA_A R-receptor do ácido γ -aminobutírico do tipo A.

Figura 14- Interações 2D e 3D dos aminoácidos do receptor 5-HT_{2A} (A) e das enzimas nNOS (B) e sGC (C) com o ADMP e respectivos antagonistas/inibidores. As ligações de hidrogênios (verde), interações hidrofóbicas (rosa) e eletrostáticas (amarelo).



Fonte: CALIXTO, 2021.

O antagonista do receptor 5-HT_{2A} cetanserina teve a menor energia de ligação (-94,50 Kcal / mol), produzindo interações de hidrogênio (verde) com os resíduos Ser 242 e Asn 343, interações de halogênio flúor com resíduos Asp 155 e interações pi-alkil hidrofóbicas com os resíduos de Val 156, Phe 234 e Val 366.

O ADMP apresentou energia de ligação (-73,86 Kcal / mol), compartilhando alguns resíduos incomuns com o antagonista, como a ligação de hidrogênio com os resíduos Asn 343, Phe 234 e Val 235, interações Pi-alkil com o resíduo Val 156 e Phe 340, como também interações hidrofóbicas do tipo T pi-pi com o resíduo Phe 339.

Quando realizado o estudo de docking molecular com mediadores da via L-Arginina/NO/GMPc, o ADMP apresentou a menor energia de ligação com a enzima nNOS (-100.82 Kcal/mol) fazendo uma ligação de hidrogênio com os resíduos de Ala 463 e interações hidrofóbicas com os resíduos de Ala 417, Phe 709, Trp 414 e Phe 589, quando comparado ao inibidor L-NAME (-91.43 Kcal/mol) que fez interações hidrofóbicas com o resíduo Trp 414 e ligações de hidrogênio com os resíduos de Ser 590 e Ala 463.

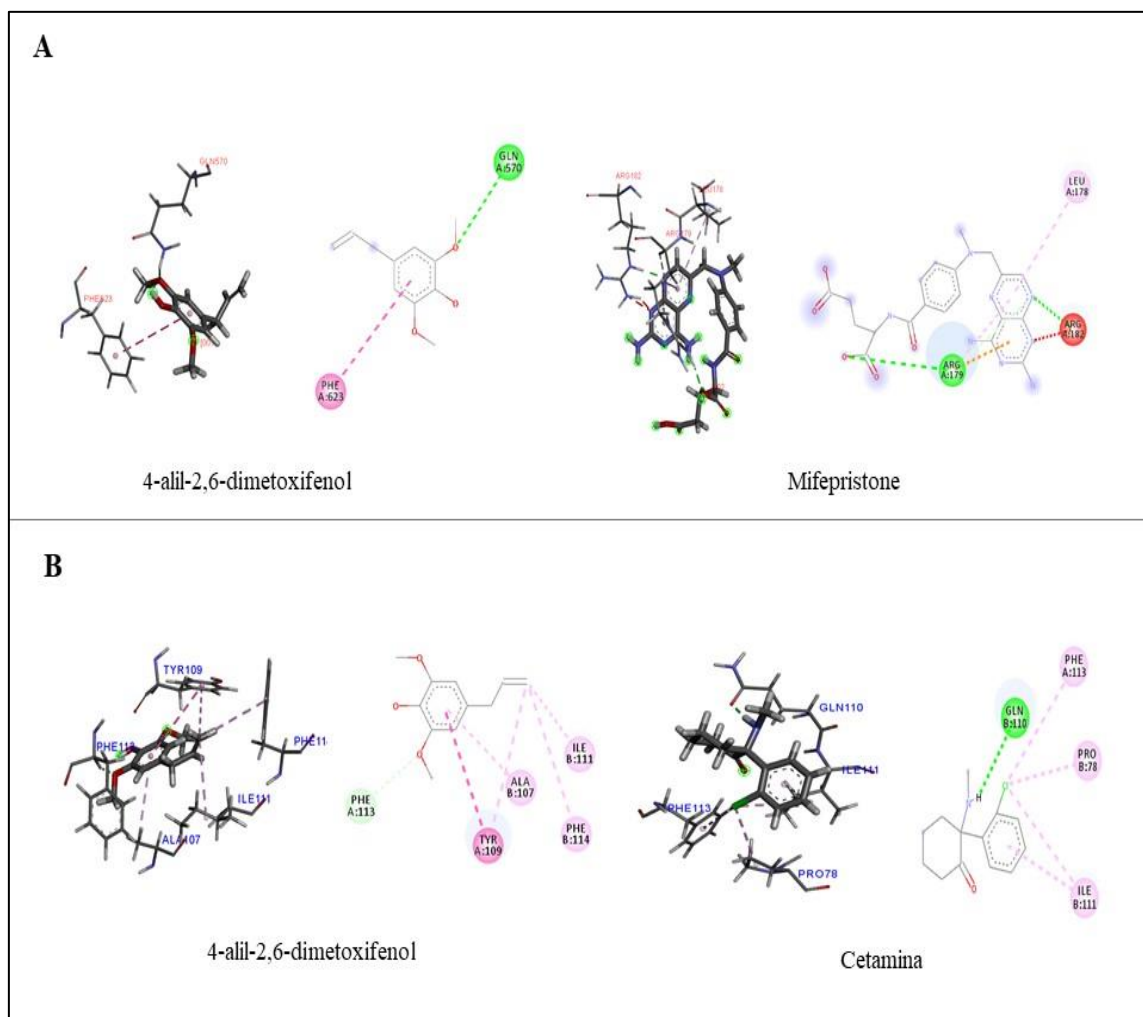
Considerando a importância do estudo e a descoberta de novos inibidores de GCs, o presente realizou a simulação de acoplamento molecular com a enzima GCs, novamente ADMP com energia de ligação (-71,28 Kcal/mol), estabelecendo ligação de hidrogênio e interações hidrofóbicas com os resíduos de Leu 596, Cys 595, Glu 526, Ala 531, Phe 484 e Thr 527, compartilhando alguns resíduos com o inibidor azul de metileno com energia de ligação (-91,49 Kcal/mol) o qual interagiu através de ligação de hidrogênio com resíduos de Glu 608, Asn 605, Ile 528, Glu 526, Leu 596, uma interação estérica com o resíduo Ala 531 e interações putativas de enxofre- π com Phe 484.

O mifepristona antagonista do receptor glicocorticóide (GR) apresentou energia de ligação, (-131,10 Kcal/mol), enquanto o ADMP apresentou energia de ligação (-68 Kcal/mol), mostrando ter uma afinidade de ligação melhor que o composto alvo do estudo.

Já com relação ao receptor NMDA o ADMP, apresentou energia de ligação (-80,71 Kcal/mol) bem próxima ao antagonista cetamina (-87,35 Kcal/mol) resultante de ligação de hidrogênio com os resíduos de Phe 113 e interações hidrofóbicas com os resíduos de Tyr 109, Ala 107, Phe 114 e Ile 111, compartilhando alguns resíduos (Phe 113 e Ile 111) com a cetamina.

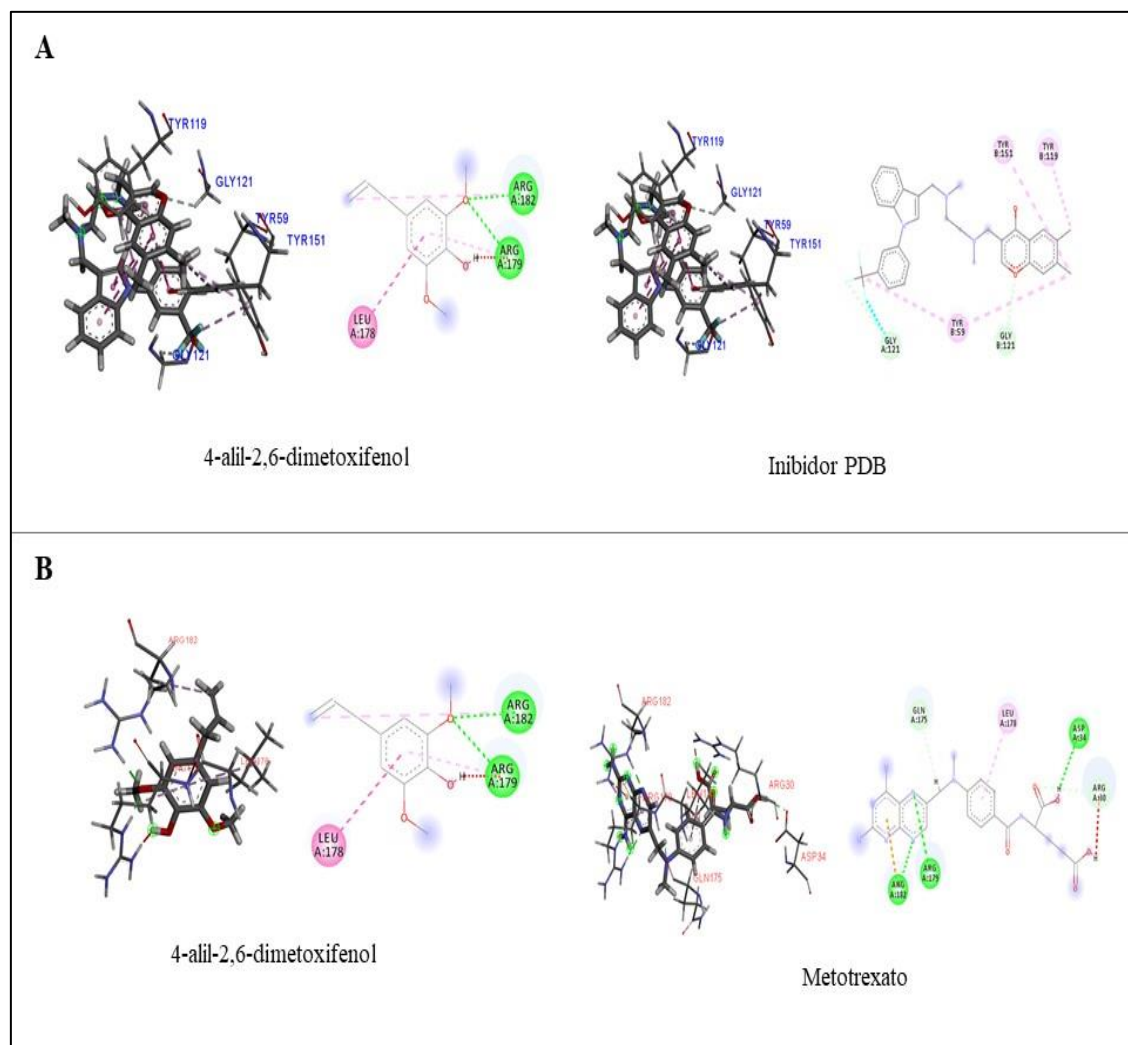
Ao fazer o docking molecular com o TNF- α o ADMP apresentou energia de ligação (71,81 Kcal/mol) como resultado da presença de ligações de hidrogênio com os resíduos de Gly 121, Leu 120 e interações hidrofóbicas com o resíduo de Tyr 119, compartilhando apenas os resíduos de Gly 121 e Tyr 129 com o inibidor (-97.14 Kcal/mol).

Figura 15- Interações 2D e 3D dos aminoácidos do receptor de glicocorticóide (GR) (A), receptor NMDA (B) com ADMP e seus respectivos antagonistas.



Fonte: Autora do trabalho.

Figura 16- Interações 2D e 3D dos aminoácidos do TNF- α (A) e IL-6 (B) com ADMP e seus respectivos inibidores.



Fonte: Autora do trabalho.

Sabendo a relevância do receptor GABA_A, foi realizado o docking molecular com o ADMP, o qual apresentou energia de ligação (-63,95 Kcal/mol), resultante de ligações de hidrogênio com os resíduos de Tyr 58, Gln 204 e ligações hidrofóbicas com os resíduos de Tyr 210, Tyr 160 e Phe 100, enquanto o diazepam com energia de ligação (-84,45 Kcal/mol) compartilha alguns resíduos com o ADMP como Tyr 58, Phe 100, Tyr 160, Tyr 210, além dos resíduos de Ser 205 e Val 203.

7.1.3 Predisposição dos riscos de toxicidade

A predisposição do risco de toxicidade *in silico*, é uma alternativa viável para determinar uma substância com menos efeitos colaterais. Para avaliação dos parâmetros de toxicidade (Mutagenicidade-*MUT*, Carcinogenicidade-*CAR*, Efeito tóxico no sistema reprodutor-*ETSR*, - Irritabilidade pele e tecido-*IPT*), foram utilizados 8 (oito) substâncias (Tabela 2), dentre estes fármacos já conhecidos no mercado, estão os que foram utilizados como droga padrão nos testes comportamentais, além do ADMP.

Tabela 2- A predisposição do risco de toxicidade de fenilpropanoides e fármacos comercializados.

MOLÉCULA	<i>MUT</i>	<i>CAR</i>	<i>ETSR</i>	<i>IPT</i>
4-ALIL-2,6 DIMETOXIFENOL (ADMP)	Nenhum	Nenhum	Nenhum	Nenhum
AZUL DE METILENO	Nenhum	Nenhum	Nenhum	Nenhum
DEXAMETASONA	Nenhum	Nenhum	Nenhum	Nenhum
DIAZEPAM	Alta	Alta	Alta	Nenhum
FLUOXETINA	Nenhum	Nenhum	Nenhum	Nenhum
IMIPRAMINA	Nenhum	Nenhum	Alta	Nenhum
L-NAME	Nenhum	Nenhum	Nenhum	Nenhum

Fonte: CALIXTO, 2021

Legenda: *MUT*-mutagenicidade, *CAR*- carcinogenicidade, *ETSR*- efeito tóxico no sistema reprodutor, *IPT*- irritabilidade pele e tecido.

Os valores de risco de toxicidade foram previstos usando o software Oasis Data Warris 5.0 e são mostrados como nenhum, baixo e alto risco, para os definidos parâmetros de toxicidade.

Os resultados mostram que o ADMP, alvo do estudo é um composto não tóxico, para todos os parâmetros avaliados, tendo resultados melhores que fármacos já consolidados no mercado, como diazepam e imipramina.

7.2 Validação *in vivo*

7. 2.1 Determinação da dose letal

A determinação da toxicidade aguda, foi realizada de acordo com a metodologia preconizada pela *Organization for Economic Cooperation and Development* (OECD), (OECD 423, 2001). Seguindo o protocolo, os animais receberam o 4-alil-2,6-dimetoxifenol por via i.p. na dose de 300 mg/kg, não promovendo a mortalidade dos três camundongos no período de 14 dias de observações, então o teste foi repetido com a mesma dose obtendo o mesmo resultado. Então, foi realizado um novo teste com a administração da dose de 2000 mg/kg que promoveu a morte de todos os animais.

Então de acordo com os resultados, a estimativa da DL_{50} é aproximadamente 500mg/kg, sendo recomendado utilizar doses inferiores a 1/3 da estimativa da DL_{50} , para uma margem de segurança em relação a toxidade aguda.

Tabela 3– Percentual de mortes em 14 dias em diferentes doses do 4-alil-2,6-dimetoxifenol.

<i>Doses do 4-alil-2,6-dimetoxifenol (mg/kg)</i>	<i>% de mortes em 14 dias</i>
2000	100%
300	0%

Fonte: CALIXTO, 2021

Partindo dos resultados obtidos, foi possível definir as doses do ADMP 25, 50 e 100 mg/kg com uma margem de segurança, as quais foram utilizadas nos testes farmacológicos específicos de avaliação da atividade antidepressiva e ansiolítica.

7.2.2. Efeito na triagem farmacológica comportamental 4-alil-2,6-dimetoxifenol

Os resultados obtidos na triagem farmacológica comportamental do ADMP na dose de (300 mg/kg i.p.) estão apresentados na tabela a seguir (Tabela 4). Os grupos apresentaram diferentes comportamentos em relação ao controle. Nos primeiros minutos após administração do ADMP (300 mg/kg i.p.), os animais apresentaram atividade de pedalar, ambulação diminuída, analgesia, ataxia, perda do reflexo auricular, perda do reflexo corneal, reflexo do endiretamento, resposta ao toque diminuída, sedação, força para agarrar e tônus muscular diminuídos.

Tabela 4- Efeitos observados do ADMP na triagem farmacológica comportamental / efeito presente (+), efeito intenso (++), efeito diminuído (-), sem efeito (0).

4-alil-2,6-dimetoxifenol (300 mg/kg)	Tempo em observação (min)				
Atividade farmacológica	Até 30'	1h	2h	3h	4h
<i>Pedalar</i>	+	0	0	0	0
<i>Ambulação diminuída</i>	+	0	0	0	0
<i>Analgesia</i>	+	+	+	—	0
<i>Ataxia</i>	++	+	0	0	0
<i>Perda do reflexo auricular</i>	++	0	0	0	0
<i>Perda do reflexo corneal</i>	++	0	0	0	0
<i>Reflexo do endiretamento</i>	+	++	++	++	++
<i>Resposta ao toque diminuída</i>	++	0	0	0	0
<i>Sedação</i>	++	0	0	0	0
<i>Força para agarrar</i>	—	+	+	+	+
<i>Tônus muscular</i>	—	+	+	+	+

Fonte: CALIXTO, 2021

Baseado nos efeitos comportamentais observados na triagem farmacológica, a substância teste nos primeiros minutos, provavelmente, apresenta efeito depressor do sistema nervoso central na dose de 300 mg/kg. Então, partimos para testes que nos permitiu avaliar a atividade antidepressiva e ansiolítica-símile nas doses de 25, 50 e 100 mg/kg.

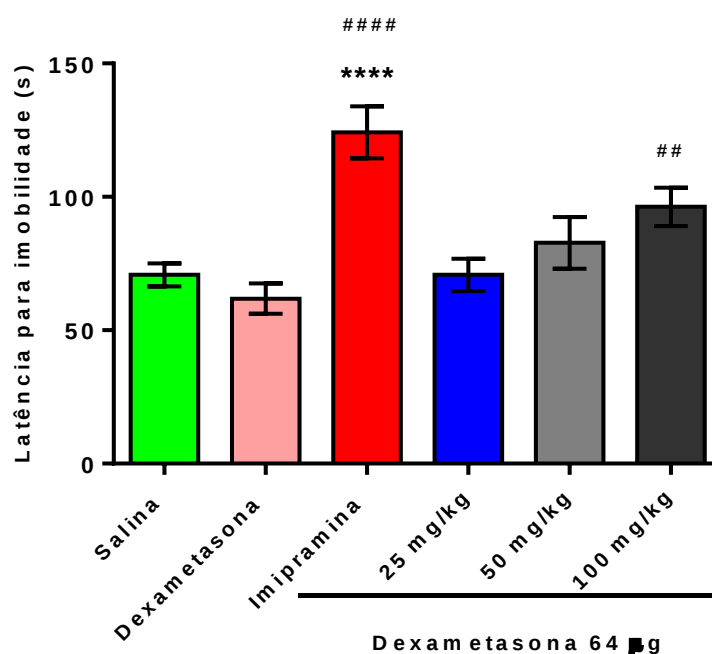
7.2.3 Avaliação da atividade antidepressiva-símile do 4-alil-2,6-dimetoxifenol (ADMP)

7.2.3.1 Efeito do ADMP no Teste de suspensão da cauda

A ANOVA de uma via mostrou que existe efeito do tratamento sobre a latência para a imobilidade no teste de suspensão da cauda [$F(5, 42) = 12,82; p < 0,0001$] (Figura 17-A). O *post-hoc* de Tukey's mostrou que os animais tratados com ADMP na dose de 100 mg/kg ($96,3 \pm 7,2$) e imipramina ($124,2 \pm 3,4$), apresentaram uma maior latência para imobilidade quando comparados com o grupo tratado com dexametasona ($61,8 \pm 5,7$). Já os grupos ADMP nas doses de 25 mg/kg ($70,7 \pm 6,0$), 50 mg/kg ($82,7 \pm 9,7$) e salina ($70,7 \pm 4,3$) não diferiram do grupo dexametasona.

Figura 17-Efeito do tratamento agudo com ADMP em camundongos no teste de suspensão da cauda.

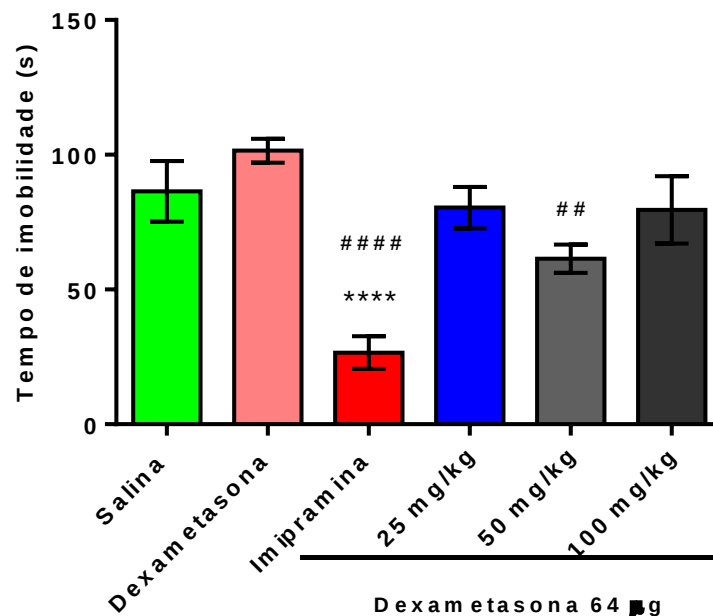
A



Legenda: Representação dos resultados obtidos pelo tratamento com ADMP (25, 50 e 100 mg/kg), salina, dexametasona (64µg/kg) e imipramina (10mg/kg) na latência para imobilidade (A). Os dados são expressos como média ± e.p.m. (n= 7). ANOVA de uma via seguido pelo teste de Tukey's. Valores significativos: **** $p < 0,0001$ versus salina, #### $p < 0,0001$, ## $p < 0,01$ versus dexametasona.

Na avaliação do tempo de imobilidade (Figura 17-B), a ANOVA de uma via evidenciou que existe efeito do tratamento [$F(5, 42) = 12,82; p < 0,0001$]. O *post-hoc* Tukey's demonstrou que os animais tratados com ADMP na dose de 50 mg/kg ($71,3 \pm 8,9$) e imipramina ($26,6 \pm 6,1$), diminuíram o tempo de imobilidade quando comparados ao grupo dexametasona ($101,5 \pm 4,4$). O ADMP na dose de 25 mg/kg ($80,4 \pm 7,7$), 100 mg/kg ($79,6 \pm 12,5$) e salina ($86,4 \pm 3,9$) não apresentaram efeito significativo em comparação ao grupo dexametasona.

B



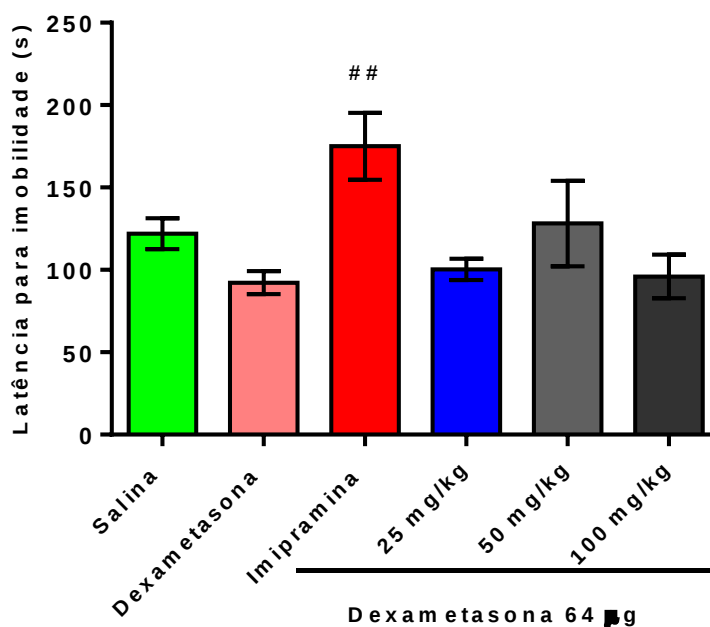
Legenda: Representação dos resultados obtidos pelo tratamento com ADMP (25, 50 e 100 mg/kg), salina, dexametasona (64µg/kg) e imipramina (10mg/kg) no tempo de imobilidade (B). Os dados são expressos como média ± e.p.m. (n= 7). ANOVA de uma via seguido pelo teste de Tukey's. Valores significativos: **** $p < 0,0001$ versus salina, #### $p < 0,0001$, ## $p < 0,01$ versus dexametasona.

7.2.3.2 Efeito do ADMP no Teste de nado forçado

A ANOVA de uma via mostrou que existe efeito do tratamento sobre a latência para a imobilidade no teste de nado forçado [$F(5, 42) = 4,035$; $p 0,0044$] (Figura 18-A). O *post-hoc* de Tukey's demonstrou que os animais tratados com imipramina ($175,0 \pm 20,2$), apresentaram uma maior latência para imobilidade quando comparados com ao grupo tratado com dexametasona ($92,3 \pm 7,0$). Enquanto os grupos tratados com ADMP nas doses de 25 mg/kg ($100,3 \pm 6,5$), 50 mg/kg ($128,1 \pm 25,8$), 100 mg/kg ($96,0 \pm 13,2$) e salina ($107,9 \pm 17,0$) não apresentaram efeito significativo em comparação ao grupo dexametasona.

Figura 18 - Efeito do tratamento agudo com ADMP em camundongos no teste de nado forçado.

A

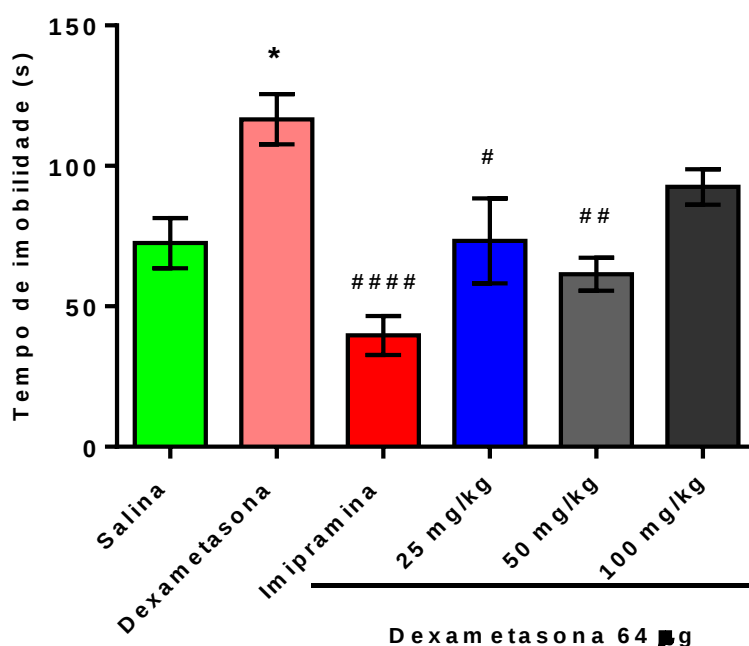


Legenda: Representação dos resultados obtidos pelo tratamento com ADMP (25, 50 e 100 mg/kg), salina, dexametasona (64µg/kg) e imipramina (10mg/kg) na latência para imobilidade (A). Cada coluna

representa média $\pm$ E.P.M. (n= 7-8). ANOVA de uma via seguido pelo Teste de Tukey's. Valores significativos: $^{##}p<0,01$ versus dexametasona.

Na avaliação do tempo de imobilidade (Figura 18-B), a ANOVA de uma via evidenciou que existe efeito do tratamento [$F(5, 42) = 8,135$; $p < 0,0001$]. O *post-hoc* de Tukey's demonstrou que os animais tratados com ADMP na dose de 25 mg/kg ($73,3 \pm 15,1$), 50 mg/kg ($61,4 \pm 5,8$), imipramina ($39,7 \pm 6,9$) e salina ($72,5 \pm 8,9$) diminuíram o tempo de imobilidade quando comparados ao grupo dexametasona ($116,6 \pm 8,9$). O ADMP na dose de 100 mg/kg ($92,5 \pm 6,4$) não apresentou diferença em comparação ao grupo dexametasona.

B



Legenda: Representação dos resultados obtidos pelo tratamento com ADMP (25, 50 e 100 mg/kg), salina, dexametasona ($64\mu\text{g/kg}$) e imipramina (10mg/kg) no tempo de imobilidade (B). Cada coluna representa média $\pm$ E.P.M. (n= 7-8). ANOVA de uma via seguido pelo Teste de Tukey's. Valores significativos: * $p<0,05$ versus salina, # $p<0,05$, ## $p<0,01$, #### $p < 0,0001$ versus dexametasona.

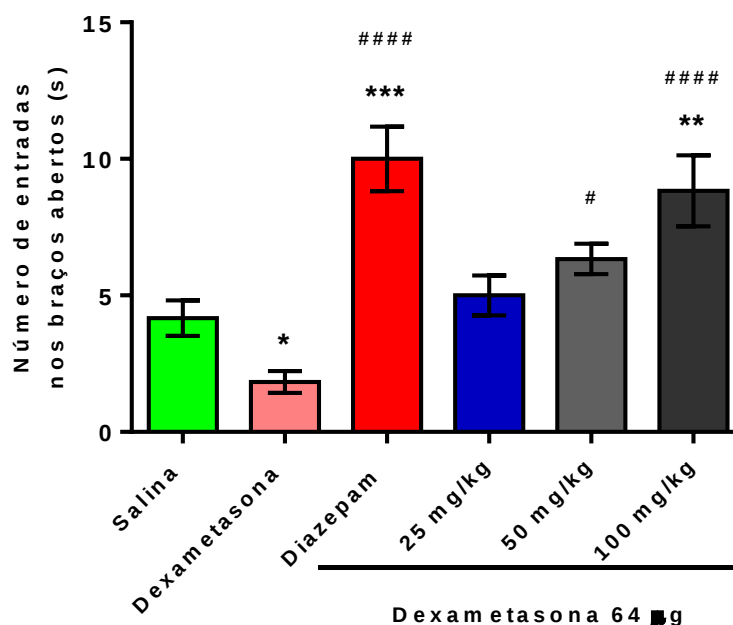
7.2.4 Avaliação da atividade ansiolítica-símile do 4-alil-2,6-dimetoxifenol (ADMP)

7.2.4.1 Efeito do ADMP no teste de Labirinto em Cruz Elevado.

No teste de labirinto em cruz elevado, considerando a análise do parâmetro número de entradas nos braços abertos, a ANOVA de uma via demonstrou que existe efeito do tratamento [$F(5, 30) = 12,15$; $p < 0,0001$] (figura 19-A). Ao realizar o *post-hoc* de Tukey's, os animais tratados com ADMP na dose de 50 mg/kg ($6,3 \pm 0,5$), 100 mg/kg ($8,8 \pm 1,3$) e diazepam ($10,0 \pm 1,2$) aumentaram o número de entradas nos braços abertos quando comparados ao grupo dexametasona ($1,8 \pm 0,4$). Ao realizar o teste t, houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre o grupo salina ($4,2 \pm 0,6$) em comparação ao grupo tratado com dexametasona.

Figura 19- Efeito do tratamento agudo com ADMP em camundongos no teste de Labirinto em Cruz Elevado.

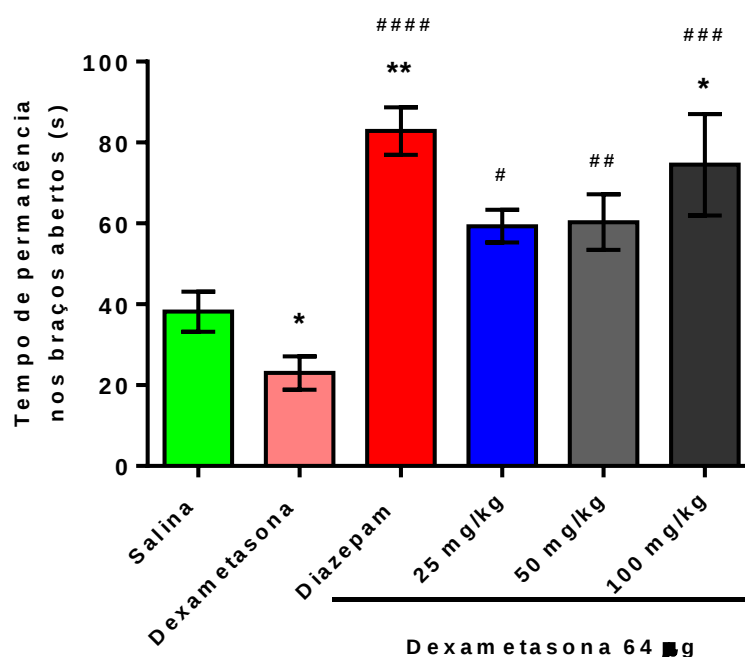
A



Legenda: Representação dos resultados obtidos pelo tratamento com ADMP (25, 50 e 100 mg/kg), salina, dexametasona (64µg/kg) e diazepam (1mg/kg) no número de entradas nos braços abertos (A). Cada coluna representa média ± E.P.M. (n= 5 - 6). ANOVA de uma via seguido pelo Teste de Tukey's. Valores significativos: # $p < 0,05$, **** $p < 0,0001$ versus dexametasona, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ versus salina e Teste t * $p < 0,05$ salina versus dexametasona.

Considerando o parâmetro tempo de permanência nos braços abertos, a ANOVA de uma via evidenciou que existe efeito do tratamento [$F(5, 30) = 10,07$; $p < 0,0001$] conforme pode ser observado no Figura 19-B. Por sua vez, o *post-hoc* de Tukey's demonstrou que os animais tratados com ADMP na dose de 25 mg/kg ($59,3 \pm 4,0$), 50 mg/kg ($60,3 \pm 6,8$), 100 mg/kg ($74,5 \pm 12,6$) e diazepam ($82,8 \pm 5,8$) aumentaram o tempo de permanência nos braços abertos quando comparados ao grupo dexametasona ($23,0 \pm 4,1$), assim como os grupos tratados com diazepam e a dose de 100 mg/kg quando comparado ao grupo tratado com salina. O teste t revelou diferença significativa ($p < 0,05$) entre salina ($38,2 \pm 4,9$) e dexametasona.

B



Legenda: Representação dos resultados obtidos pelo tratamento com ADMP (25, 50 e 100 mg/kg), salina, dexametasona (64µg/kg) e diazepam (1mg/kg) no tempo de permanência nos braços abertos (B). Cada coluna representa média $\pm$ E.P.M. (n= 5 - 6). ANOVA de uma via seguido pelo Teste de Tukey's. Valores significativos: # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$, #### $p < 0,0001$ versus dexametasona, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ versus salina e Teste t * $p < 0,05$ Salina versus dexametasona.

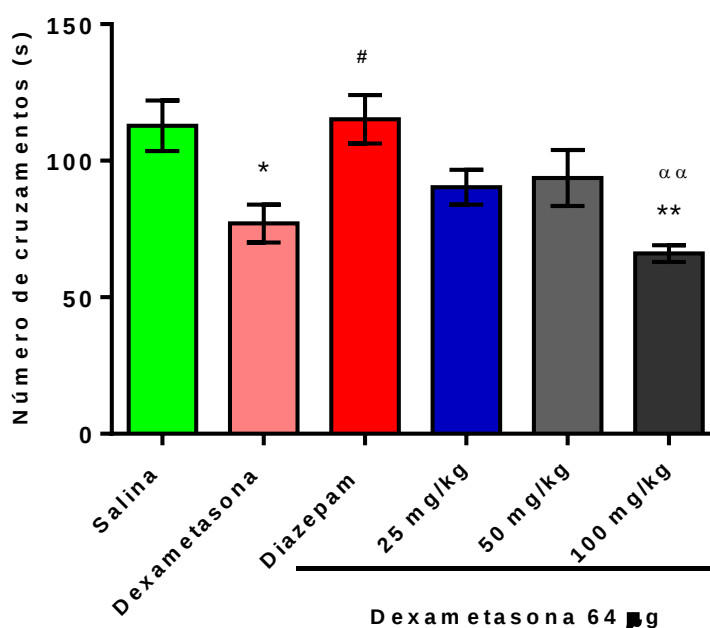
7.2.4.2 Efeito do 4-alil-2,6-dimetoxifenol no teste de Campo aberto

Buscando analisar alterações na atividade locomotora e na capacidade de exploração dos animais, foram analisados o número de cruzamentos, percentual de permanência no centro e número de *rearings*.

Na avaliação do parâmetro número de cruzamentos dos animais no campo aberto, a ANOVA de uma via [$F(5, 36) = 6,131$; $p = 0,0003$] (Figura 20-A) evidenciou que existe efeito do tratamento. O *post-hoc* de Tukey's demonstrou que há diferença significativa entre os grupos tratados com salina ($112,8 \pm 9,3$) e diazepam ($115,2 \pm 8,8$) quando comparado ao grupo tratado com dexametasona ($77,0 \pm 6,8$), assim como há diferença significativa entre o grupo tratado com a dose de 100 mg/kg ($66 \pm 3,04$) quando comparado ao grupo tratado com salina e diazepam.

Figura 20 - Efeito do tratamento agudo com ADMP em camundongos no teste de campo aberto.

A

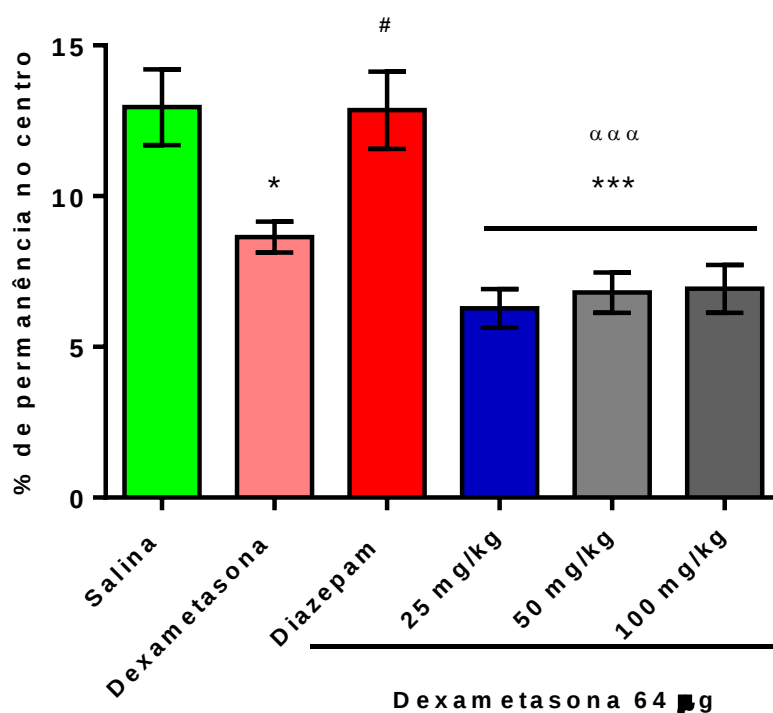


Legenda: Representação dos resultados obtidos pelo tratamento com ADMP (25, 50 e 100 mg/kg), salina, dexametasona (64μg/kg) e diazepam (1mg/kg) no número de cruzamentos (A). Cada coluna

representa média $\pm$ E.P.M. (n= 6 - 7). ANOVA de uma via seguido pelo Teste de Tukey's. Valores significativos: * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ versus salina, # $p < 0,05$ versus dexametasona, $\alpha\alpha p < 0,01$ versus diazepam.

No parâmetro percentual de tempo no centro, a ANOVA de uma via revelou que existe efeito dos tratamentos [$F(5,36) = 11,34$; $p = 0,0001$] (Figura 20-B). O *post-hoc* de Tukey's demonstrou diferença estatística significativa entre os grupos salina ($12,0 \pm 1,5$) e diazepam ($12,8 \pm 1,3$) quando comparado a dexametasona ($8,6 \pm 0,5$), não havendo diferença estatística entre os grupos tratados com ADMP nas doses de 25 mg/kg ($6,2 \pm 0,6$), 50 mg/kg ($6,8 \pm 0,6$) e 100 mg/kg ($6,9 \pm 0,8$).

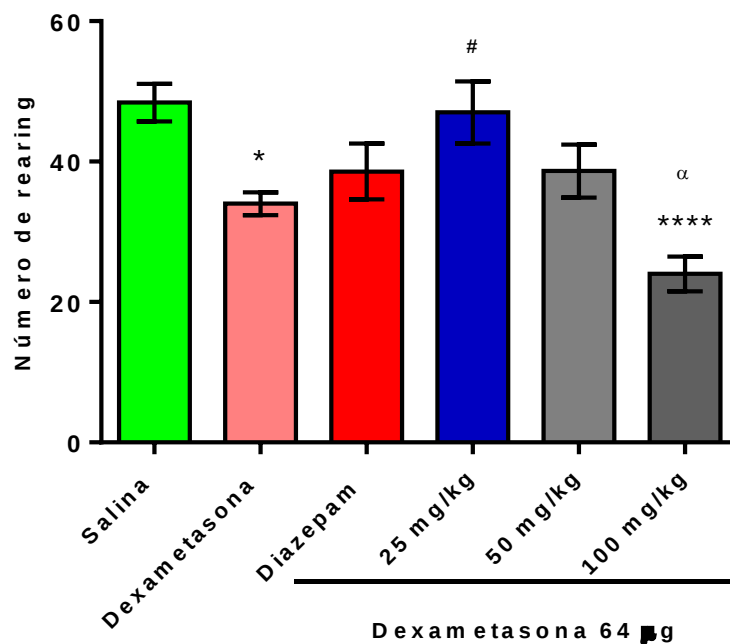
B



Legenda: Representação dos resultados obtidos pelo tratamento com ADMP (25, 50 e 100 mg/kg), salina, dexametasona (64 μ g/kg) e diazepam (1mg/kg) no % percentual de permanência no centro (B). Cada coluna representa média $\pm$ E.P.M. (n= 6- 7). ANOVA de uma via seguido pelo teste de Tukey's. Valores significativos: * $p < 0,05$ *** $p < 0,001$ versus salina, # $p < 0,05$ versus dexametasona, $\alpha\alpha\alpha p < 0,001$ versus diazepam.

Na avaliação do número de *rearing*, a ANOVA de uma via mostrou que existe efeito dos tratamentos [$F(5, 36) = 9,835$; $p = 0,0001$] (Figura 20-C). O *post-hoc* de Tukey's demonstrou que houve diferença estatística significativa nos animais tratados com salina ($48,4 \pm 2,6$) e ADMP na dose de 25 mg/kg ($47,0 \pm 1,6$), quando comparado ao grupo tratado com dexametasona ($34,0 \pm 1,6$). Não houve diferença nos grupos tratados com ADMP nas doses de 25 mg/kg ($47,0 \pm 1,6$) e 50 mg/kg ($38,6 \pm 3,8$) quando comparado ao grupo tratado com diazepam ($38,6 \pm 3,9$). No entanto, houve diferença estatística significativa no grupo tratado com a dose de 100 mg/kg ($24,0 \pm 2,4$), quando comparado ao grupo tratado com diazepam ($38,6 \pm 3,9$).

C



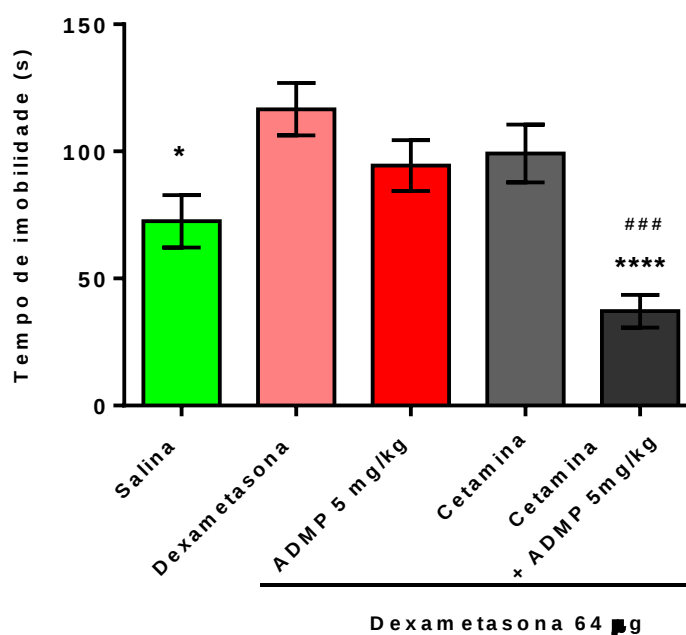
Legenda: Representação dos resultados obtidos pelo tratamento com ADMP (25, 50 e 100 mg/kg), salina, dexametasona (64µg/kg) e diazepam (1mg/kg) no número de rearing (C). Cada coluna representa média $\pm$ E.P.M. (n= 6-7). ANOVA de uma via seguido pelo teste de Tukey's. Valores significativos: * $p < 0,05$, **** $p < 0,0001$ versus salina. # $p < 0,05$ versus dexametasona $^{\alpha}p < 0,05$ versus diazepam.

7.2.5 Mecanismo de ação

7.2.5.1 Envolvimento dos receptores NMDA no efeito do tipo antidepressivo do ADMP

A análise da ANOVA de uma via revelou que existe efeito dos tratamentos [$F(4,30) = 9.638$; $p = 0,0001$] (Figura 21). O post hoc de Tukey's revelou que a cetamina sozinha não causou qualquer efeito no tempo de imobilidade, enquanto o pré-tratamento com dose sub-ativa (1 mg/kg) combinada com ADMP (5 mg/kg dose sub-ativa) ($37,1 \pm 6,4$) reduziu o tempo de imobilidade em comparação ao grupo cetamina ($99,1 \pm 11,3$) e dexametasona ($116,6 \pm 10,3$).

Figura 21 Envolvimento do receptor NMDA na atividade antidepressiva do ADMP no teste de nado forçado, considerando o parâmetro tempo de imobilidade.

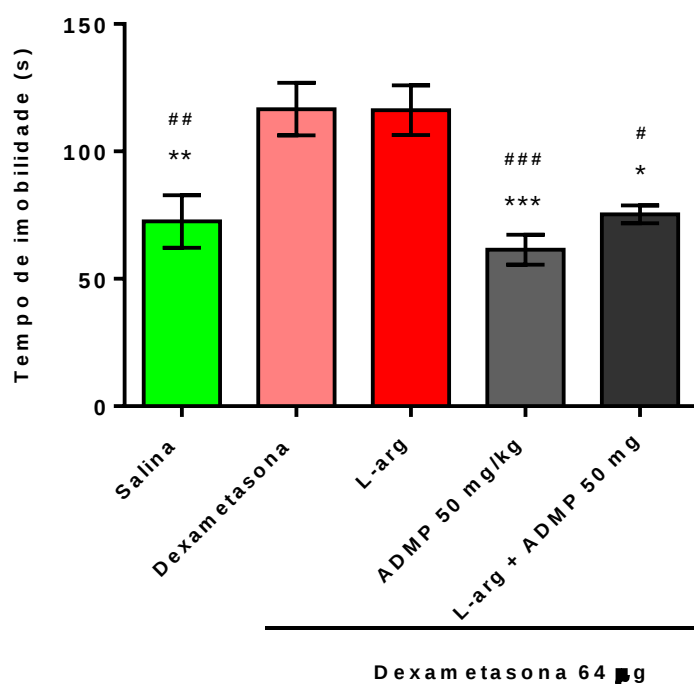


Legenda: Representação dos resultados obtidos pelo tratamento com salina, dexametasona (64 µg/kg), ADMP (5 mg/kg), cetamina (1 mg/kg). Cada coluna representa média ± E.P.M. (n= 7). ANOVA de uma via seguido pelo teste de Tukey's. Valores significativos: * $p < 0,05$, **** $p < 0,0001$ versus dexametasona e ### $p < 0,01$ versus cetamina.

7.2.5.2 O efeito do 4-alil-2,6-dimetoxifenol (ADMP) em mediadores da via L-Arginina/NO/ GMPc

A análise da ANOVA de uma via revelou que existe efeito dos tratamentos [$F(4,31) = 9,924$; $p = 0,0001$] (Figura 22). A análise do post hoc de Tukey's revelou que o tratamento com ADMP (50 mg/kg) ($61,4 \pm 5,9$) reverteu o efeito da L-arginina ($p < 0,001$). Não houve diferença significativa entre o grupo dexametasona ($116,6 \pm 10,3$) e o grupo tratado com L-arginina ($116,2 \pm 9,7$).

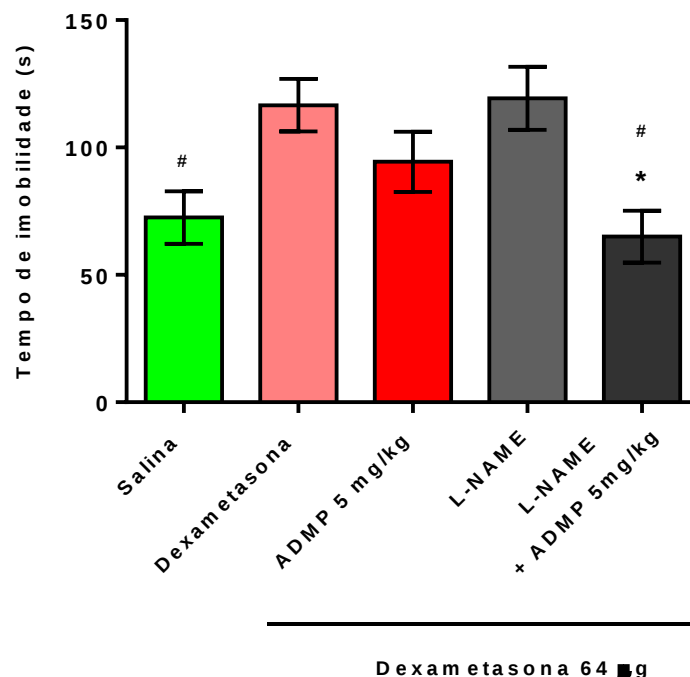
Figura 22- Envolvimento do precursor do NO (L-arginina) na atividade antidepressiva de ADMP no teste de nado forçado, considerando o parâmetro tempo de imobilidade.



Legenda: Representação dos resultados obtidos pelo tratamento com salina, dexametasona (64µg/kg), L-arg (750 mg/kg) ADMP (50 mg/kg) no teste de nado forçado. Cada coluna representa média ± E.P.M. (n= 6 - 7). ANOVA de uma via seguido pelo teste de Tukey's. Valores significativos: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ versus dexametasona e # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$ versus L-arginina.

A análise da ANOVA de uma via revelou que existe efeito dos tratamentos [$F(4,28) = 5,047$; $p = 0,0034$] (Figura 23). O *post hoc* de Tukey's revelou que o L-NAME sozinho não reduziu o tempo de imobilidade ($119,3 \pm 12,3$), enquanto o pré-tratamento com a mesma dose sub-ativa de L-NAME (10 mg/kg) combinada com ADMP (5 mg/kg dose sub-ativa) ($65,0 \pm 10,2$) reduziu o tempo de imobilidade em comparação ao grupo L-NAME e dexametasona ($116,6 \pm 10,31$) ($p < 0,05$).

Figura 23- Envolvimento da nNOS na atividade antidepressiva de ADMP no teste de nado forçado, considerando o parâmetro tempo de imobilidade.

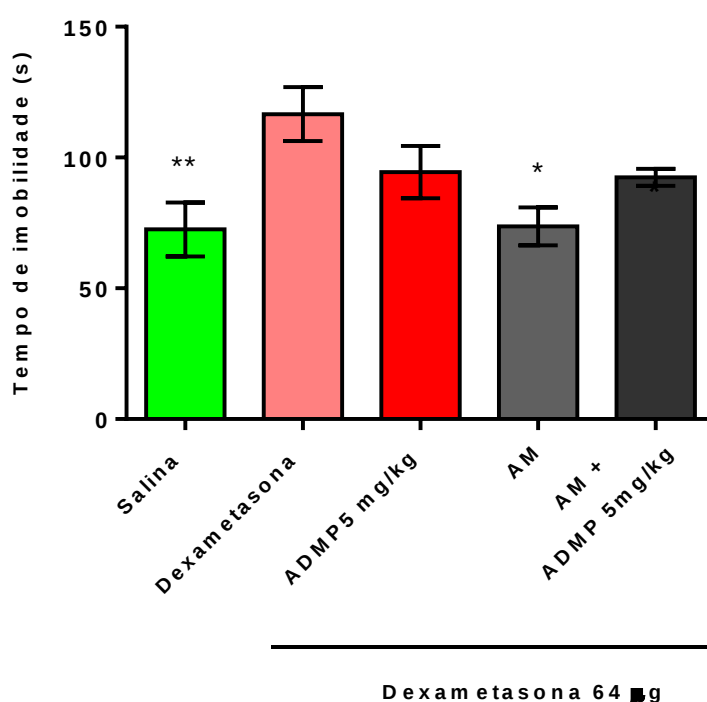


Legenda: Representação dos resultados obtidos pelo tratamento com salina, dexametasona (64µg/kg), ADMP (5 mg/kg), L-NAME (10 mg/kg) no teste de nado forçado. Cada coluna representa média ± E.P.M. (n= 6). ANOVA de uma via seguido pelo teste de Tukey's. Valores significativos: * $p < 0,05$ versus dexametasona e # $p < 0,05$ versus L-NAME.

O azul de metileno (AM) é um inibidor de ambas as enzimas a NOS e GCs. A análise da ANOVA de uma via revelou que existe efeito dos tratamentos [$F(4,30) = 4,334$; $p = 0,0069$] (Figura 24). O *post hoc* de Tukey's revelou que AM ($73,7 \pm 7,3$) administrado sozinho foi capaz de reduzir o tempo de imobilidade em comparação ao grupo tratado com dexametasona ($116,6$

$\pm 10,3$). No entanto, o grupo tratado com AM combinado com ADMP (5 mg/kg dose ineficaz) ($92,4 \pm 3,2$) não reduziu o tempo de imobilidade, em comparação ao grupo tratado com AM ($73,7 \pm 7,3$).

Figura 24- Envolvimento do GMPc na atividade antidepressiva do ADMP no teste de nado forçado, considerando o parâmetro tempo de imobilidade.



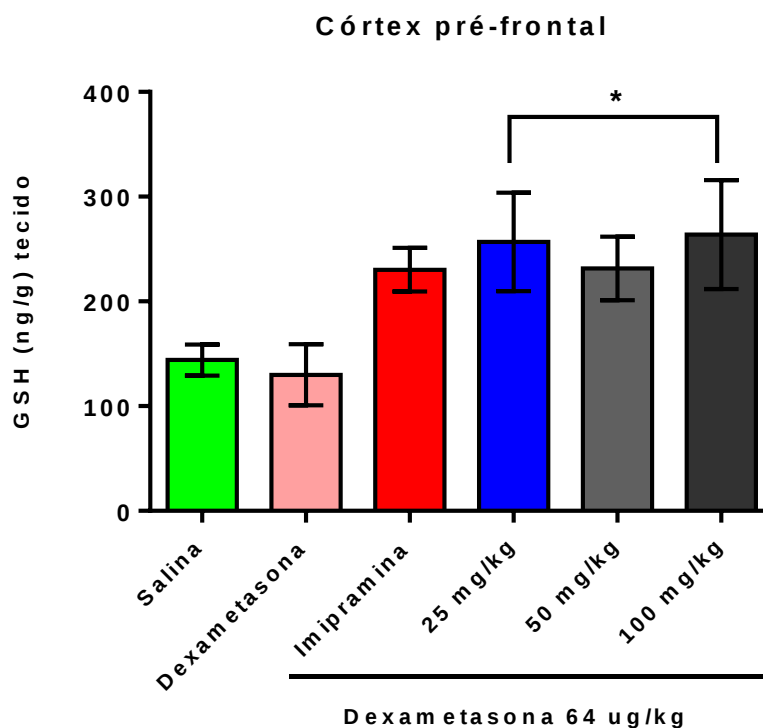
Legenda: Representação dos resultados obtidos pelo tratamento com salina, dexametasona (64µg/kg), ADMP (5 mg/kg), AM (10 mg/kg) no teste de nado forçado. Cada coluna representa média $\pm$ E.P.M. (n= 6). ANOVA de uma via seguido pelo teste de Tukey's. Valores significativos: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ versus dexametasona.

7.2.6 Determinação de parâmetros de estresse oxidativo

Na análise da concentração de GSH, a ANOVA de uma via mostrou que existe efeito dos tratamentos [$F(5, 42) = 2,736$; $p = 0,0315$] (Figura 25). Os animais tratados com as três doses de ADMP 25 mg/kg ($256,8 \pm 47,0$), 50 mg/kg ($231,6 \pm 30,26$) e 100 mg/kg ($263,9 \pm 51,8$) aumentaram de forma significativa ($p < 0,05$) a concentração de GSH no córtex pré-frontal

quando comparados ao grupo dexametasona. Não houve efeito significativo nos animais tratados com dexametasona ($129,9 \pm 29,3$) em comparação ao grupo salina ($144,1 \pm 14,8$).

Figura 25 – Efeito da administração da dexametasona, imipramina e ADMP sobre a concentração de GSH no córtex pré-frontal de camundongos.



Legenda: Representação dos resultados obtidos pelo tratamento com salina, dexametasona ($64\mu\text{g/kg}$), imipramina (10 mg/kg) ADMP ($25,50,100\text{ mg/kg}$), no teste de nado forçado. Cada coluna representa média $\pm$ E.P.M. ($n= 7-8$). ANOVA de uma via seguido pelo Teste de Tukey's. Valores significativos: $*p<0,05$ versus dexametasona.

6. DISCUSSÃO

O TDM é um transtorno mental grave caracterizado por uma série de sintomas cognitivos, físicos e comportamentais, afetando milhões de pessoas em todo o mundo, de acordo com a OMS, em 2015, 322 milhões de pessoas em todo o mundo tinham depressão e 264 milhões tinham ansiedade (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2017), em 2030 a depressão será a principal causa da carga de doenças em todo o mundo (DARCET et al., 2016; DWYER et al., 2020). Sabe-se que a exposição a circunstâncias estressantes ao longo da vida é um dos fatores de risco para desenvolver depressão (IOB; KIRSCHBAUM; STEPTOE, 2020; KENDLER et al., 2010). O eixo HPA é o principal componente da rede neuroendócrina que responde ao estresse, sua desregulação tem sido associada a transtornos mentais (LEISTNER; MENKE, 2020).

No presente estudo, induzimos o comportamento depressivo e ansiolítico-símile em camundongos e ao receberem o ADMP estes comportamentos foram revertidos, efeitos estes associados ao envolvimento dos sistemas glutamatérgico e oxidonitrérgico.

Considerando a relevância de alguns alvos na fisiopatologia da depressão, realizamos inicialmente um estudo *in silico* de docking molecular, para analisar e identificar as melhores energias e interações ligante-alvo (receptor ou enzima), além de prever o risco de toxicidade da substância em estudo.

As melhores energias de ligação entre o ADMP, foram observadas em alvos da via L-arginina/NO/GMPc (nNOS) e via glutamatérgica representada pelo NMDAR. Representantes da via monoaminérgica (5-HT_{2A}) apresentaram energia de ligação próxima ao antagonista, enquanto GR, TNF- α , IL-6 e GABA_AR, apresentaram energia de ligação negativa, com valores de energia divergentes dos antagonistas, inibidores e benzodiazepínico.

O receptor 2A da serotonina (5-HT_{2A}), é um dos subtipos de receptores acoplados à proteína G (GPCRs), constituído por 471 aminoácidos e sete domínios transmembrana (BOMBARDI e DI GIOVANNI, 2013). Esse receptor é amplamente distribuído no SNC e sistema nervoso periférico (SNP), com expressão considerável no córtex pré-frontal e hipocampo, regiões cerebrais relacionadas a doenças neurológicas e psiquiátricas (CORTES-ALTAMIRANTE et al., 2018; JAGGAR et al., 2019; KULIKOVA et al., 2018).

Os receptores 5-HT_{2A} são expressos em axônios como também em dendritos, próximos ao receptor NMDA (DANTSUJI et al., 2019). Por sua vez, os receptores 5-HT_{2A} estão envolvidos na ativação da Src quinase em células neurais, e sua ativação regula positivamente a função do receptor NMDA contribuindo para a elevação da concentração de cálcio (MECHANISM; MIGRAINE, 2002; SCHMID; BOHN, 2010) e a ativação da nNOS é dependente de cálcio a qual acelera a síntese de óxido nítrico (NO) (HANSON et al., 2018).

Em nosso estudo *in silico* ADMP apresentou energia de ligação próxima ao antagonista (cetancerina) resultante da presença de ligações de hidrogênios nas quais são importantes no reconhecimento molecular, aumentando a afinidade entre fármaco-receptor (CHEN et al., 2016). Em um outro estudo realizado pelo nosso grupo de pesquisa, fenilpropanoides como o metil-eugenol e orto-eugenol apresentaram energia de ligação próximas ao ADMP na interação com o receptor 5-HT_{2A}. (DA SILVA CALIXTO et al., 2020).

O TDM é associado a disfunção do eixo HPA, que envolve consequentemente a secreção de glicocorticoides em excesso (NGUYEN et al., 2018). Os receptores glicocorticoides (GR) são responsáveis por mediar os efeitos diretos dos glicocorticoides, e a ativação persistente de GR por altos níveis de glicocorticoides pode resultar em dano neural, com alterações moleculares e consequentemente comportamentais, resultando em TDM e outras doenças neuropsiquiátricas (CANET et al., 2018).

Estudos não-clínicos (ATTOUI, GUEEDRI e MAKHLOUFI, 2019; WANG et al., 2019; PAPILLOUD et al; 2019; CALABRESE et al., 2020) e clínicos (BLOCK et al., 2018; SCHATZBERG, LECTURE e KONGRESS, 2015) têm empregado o tratamento com antagonistas dos GRs na tentativa de limitar os efeitos deletérios do excesso dos glicocorticoides, é o caso do antagonista seletivo CORT 108297 que diminuiu as respostas neuroendócrinas e comportamentais ao estresse no teste de nado forçado, semelhante à mifepristona (SOLOMON et al., 2014).

Estudo realizado com o modelo de depressão neuroendócrina aguda mostrou que a administração de dexametasona (64 µg/kg) causa um desequilíbrio na ativação de receptores mineralocorticoides (MR) e em especial ao GRs por ser um agonista mais potente, levando assim consequentemente ao desequilíbrio do eixo HPA (DE SOUZA et al., 2019).

A mifepristona é um antagonista competitivo do GR, que demonstrou benefícios terapêuticos em estudos de fase 2 e 3 em pacientes com depressão psicótica, uma forma grave de depressão maior (BLOCK et al., 2018). No entanto, com o estudo *in silico* não foi possível

identificar e confirmar o antagonismo do ADMP ao interagir com o GR, uma vez que a substância em estudo apresentou energia de ligação desfavorável, quando comparada ao antagonista.

A produção excessiva de óxido nítrico (NO) por mediadores da via L-arginina/NO/GMPc está relacionada com o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas e transtornos de humor como a depressão, por aumentar a neurodegeneração, resultante do processo inflamatório no cérebro (MILLER; RAISON, 2017; YUSTE et al., 2015).

Inibidores específicos de mediadores da via L-arginina/NO/GMPc têm sido alvo de estudos na busca de novos fármacos antidepressivos (WANG et al., 2019). Morin, um composto polifenólico e neuroativo, mostrou efeito antidepressivo em modelo animal, por mediação da via L-arginina/NO/GMPc (BEM-AZU et al., 2019).

O estudo de docking molecular revelou que o ADMP apresenta energia de ligação favorável para uma melhor interação com mediadores da via L-arginina/NO/GMPc com ênfase para a nNOS.

Um dos primeiros estudos de docking molecular com inibidores da nNOS: L-NAME, azul de metileno (AM), 7-nitroindadazol (7-NI) e L-Nitro arginina (7-NA), concluiu que o L-NAME tem uma boa afinidade de ligação, resultante das ligações de hidrogênio, similar ao 7-NA, que tem atividade semelhante a antidepressivos (CHAUDHARI et al., 2010).

De forma interessante, o potencial terapêutico do AM, um inibidor da monoamina oxidase A (MAO-A) e inibidor não seletivo da NOS e sGC tem sido estudado para o tratamento de distúrbios neurodegenerativos, como a doença de Alzheimer, além de apresentar atividade antidepressiva e ansiolítica em modelos não-clínicos (DELPORT et al., 2017).

Outro possível alvo de ação dos antidepressivos é a via glutamatérgica, sendo considerada uma das vias mais promissoras no desenvolvimento de agentes antidepressivos para pacientes resistentes ao tratamento farmacológico com antidepressivos que envolvam a recaptação e/ou receptores para os neurotransmissores monoaminérgicos (DANG et al., 2014; FASIPE, 2019). No presente estudo *in silico*, foi possível observar que o ADMP apresenta energia de ligação muito próxima a cetamina, indicando uma afinidade de ligação ao receptor similar a este antagonista.

A cetamina é antagonista do receptor NMDA e um dos antidepressivos mais interessante, pois esta droga causa efeitos antidepressivos de início rápido e sustentada em pacientes com depressão resistente ao tratamento (HASHIMOTO, 2016).

O docking molecular com as citocinas IL-6 e TNF- α e (o receptor GABA_A) não apresentaram energias de ligação tão favoráveis na interação com o ADMP, quando comparado com os seus respectivos antagonistas, sendo necessário mais estudos principalmente *in vivo*, para confirmar algum tipo de envolvimento na fisiopatologia da depressão e ansiedade.

De acordo com nossos resultados *in silico*, o ADMP não apresentou toxicidade para os parâmetros avaliados, no entanto sugerimos estudos *in vitro* e *in vivo* para corroborar com o presente estudo.

Considerando estudos de fenilpropanoides com estrutura similar ao ADMP com efeito no SNC como o orto-eugenol, metil-eugenol e ácido cinâmico com atividade antidepressiva (ARAUJO, 2018; DINIZ et al., 2019; VASCONCELOS, 2018), partimos para os estudos preliminares *in vivo* com o objetivo inicialmente de determinar a DL₅₀ e o screening da substância com possível atividade no SNC por meio da triagem farmacológica comportamental.

A toxicidade aguda corresponde a efeitos indesejados dependente da dose, incluindo a mortalidade que pode ocorrer imediatamente ou em um curto intervalo de tempo após administração única ou múltipla de determinada substância (CHINEDU; AROME; AMEH, 2013).

De acordo com a metodologia preconizada pela OECD e seguindo o protocolo recomendado, pôde-se estimar a DL₅₀, pela via intraperitoneal em aproximadamente 500 mg/kg de peso corporal, o que forneceu uma boa margem de segurança para as doses utilizadas nesse estudo, ou seja, até 1/3 da DL₅₀.

A triagem farmacológica comportamental é uma metodologia simples e relevante para o screening de substâncias com possível atividade no SNC, no qual observa-se no animal comportamentos pré-estabelecidos de atividade farmacológica estimulante ou depressora, entre outros comportamentos que favorecem um direcionamento para estudos mais específicos (DE ALMEIDA et al., 1999).

No presente estudo, a dose de 300 mg/kg nos primeiros 30 minutos da triagem farmacológica apresentou algumas atividades farmacológicas, indicativos de um possível efeito depressor (ALMEIDA; OLIVEIRA, 2006), como pedalar, ambulação diminuída, analgesia,

ataxia, perda do reflexo auricular, perda do reflexo corneal, reflexo do endireitamento, resposta ao toque diminuída, sedação, força para agarrar, tônus muscular diminuídos. No entanto, após uma hora de observação esses efeitos foram normalizados. Nossos resultados, foram semelhantes ao estudo realizado por Andrade (2019), em que o álcool cinâmico, um fenilpropanoide, na dose de 200 mg/kg, também apresentou nos 30 primeiros minutos, analgesia, ataxia, perda de reflexo auricular, reflexo de endireitamento, resposta ao toque e ambulação diminuída.

Assim, tendo o indicativo de que o ADMP apresentou atividade depressora do SNC na dose de 300 mg/kg, partimos para a investigação da sua atividade antidepressiva.

O estudo *in vivo* investigou a indução do comportamento do tipo depressivo e ansioso por dexametasona, um modelo já validado na literatura científica, no qual os animais desenvolvem aspectos fisiológicos análogos aos observados em humanos (validade de constructo), apresentando validade preditiva, uma vez que medicamentos já comercializados para o tratamento da depressão e ansiedade podem reverter alterações do modelo (CONTI et al., 2017).

Os glicocorticoides sintéticos como a dexametasona, tem sido utilizado para o tratamento de uma variedade de doenças associadas a dor e inflamação. No entanto, a sua prescrição permanece controversa, devido a efeitos colaterais, em nível molecular, celular e tecidual (BLACK; GRODZINSKY, 2019), além disso a administração de dexametasona pode induzir mudanças dependente da dose no SNC, causando alterações no humor e cognição (FIETTA; FIETTA; DELSANTE, 2009). O tratamento com a dexametasona, um agonista sintético dos receptores glicocorticoides, tem sido associado à neurotoxicidade e doenças neuropsiquiátricas como depressão e ansiedade (LI et al., 2014).

Nossos resultados mostraram que a indução do comportamento do tipo depressivo e ansioso foi eficiente em aumentar o tempo de imobilidade no teste de nado forçado e reduzir o número de entradas nos braços abertos, além de reduzir a atividade locomotora e exploratória quando comparados ao controle (salina).

Em um estudo similar ao nosso, o tratamento agudo de uma única dose de dexametasona aumentou o tempo de imobilidade no teste de suspensão da cauda, induzindo um comportamento depressivo em animais, os quais foram neutralizados com venlafaxina um antidepressivo convencional, o mesmo ainda sugere que os mecanismos relacionados com o efeito rápido da dexametasona estão baseados em mudanças neuroquímicas rápidas de monoaminas em áreas do cérebro, envolvidas com a emoção (DE SOUZA et al., 2019).

A ação do efeito rápido da dexametasona, foi investigado na análise de correntes pós-sinápticas em neurônios magnocelulares do núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN), indicando um mecanismo não genômico de ação de glicocorticoides, envolvendo ativação sequencial de múltiplas quinases, fosfolipase C e mobilização de cálcio intracelular (HARRIS et al., 2019). Ou seja, a dexametasona administrada de forma única é capaz de induzir ao comportamento do tipo depressivo e ansiogênico.

Então, buscando avaliar o comportamento do tipo depressivo e o efeito do ADMP, foi realizado o teste de suspensão da cauda e nado forçado e em ambos os testes, a dose 50 mg/kg apresentou uma redução significativa no tempo de imobilidade, assim como a dose de 25 mg/kg no teste de nado forçado, mostrando ter uma atividade antidepressiva promissora.

Estudos do nosso grupo, com indução do comportamento do tipo depressivo por dexametasona (64 ug/kg) também demonstrou efeito antidepressivo de fenilpropanoides (metil-eugenol e orto-eugenol) no teste de suspensão da cauda, com redução no tempo de imobilidade e aumento na latência para imobilidade na dose de 50 mg/kg (CAVALCANTE, 2018; ARAÚJO, 2018).

O labirinto em cruz elevado é um teste bastante utilizado na psicofarmacologia para avaliar a ação ansiolítica ou ansiogênica de substâncias isoladas ou compostos. Os efeitos do ADMP foram observados em relação ao número de entradas e tempo de permanência nos braços abertos, considerados os parâmetros para análise.

No presente estudo, observou-se que a dexametasona induziu o comportamento do tipo ansiogênico, sendo que o número de entradas e o tempo de permanência nos braços abertos foram normalizados de maneira significativa, com a administração do ADMP em todas as doses testadas, bem como a administração do diazepam. Animais tratados com fármacos benzodiazepínicos como diazepam, tendem a entrar e permanecer mais tempo nos braços abertos, indicando assim um efeito ansiolítico (DOUKKALI et al., 2016).

Nossos resultados no teste de labirinto em cruz elevado são corroborados pelo estudo realizado por HECK et al., 2019, no qual observou que a exposição a dexametasona induziu comportamento do tipo ansiogênico, com redução significativa no tempo de permanência nos braços abertos em comparação ao grupo salina. Os animais submetidos ao teste com ADMP mostraram efeito do tipo ansiolítico nas três doses testadas no teste de labirinto em cruz elevado, além disso, no teste de campo aberto não foi observado alteração na atividade locomotora na dose de 50 mg/kg, como também não houve alteração no comportamento exploratório nos

animais tratados nas doses de 25 e 50 mg/kg. Sugerindo assim, um efeito ansiolítico promissor deste fenilpropanoide.

Corroborando com um estudo realizado por KWON et al., 2014, no qual demonstrou que um composto fenilpropanoide [ácido 3-(3,4-di-hidroxifenil)-lático] com propriedade antioxidante já bem conhecida, produziu um efeito semelhante a um ansiolítico (diazepam) no teste de labirinto em cruz elevado, sem apresentar comprometimento na atividade locomotora espontânea.

O teste de campo aberto é um procedimento metodológico de avaliação comportamental relativamente padronizado e confiável, bastante utilizado para avaliar efeitos de drogas nos níveis de ansiedade e atividade locomotora dos animais (BROADHURST, 1969).

No presente estudo, não houve diferença significativa nos grupos tratados com a dose de 50 mg/kg em comparação ao grupo tratado com diazepam. Enquanto o grupo tratado com a dose de 100 reduziu de forma significativa o número de cruzamentos em comparação ao grupo salina e diazepam. Os resultados com relação ao percentual de permanência no centro, podem estar associados a uma sensibilidade do método que pode variar levando a observações de achados distintos (BEKTAS; ARSLAN; ALYU, 2020).

De acordo com Sestakova et al., (2013) o NO pode estar envolvido na modulação da atividade motora e no comportamento relacionado à ansiedade, além disso, os efeitos dos inibidores da síntese de NO dependem da dose e duração do tratamento.

Corroborando com o presente estudo Halcak et al., (2000) mostrou que o tratamento crônico com L-name na dose de 40 mg/kg por 4 semanas reduziu a atividade locomotora, simultaneamente com redução da atividade da NOS no córtex cerebral.

O número de rearing é um índice relacionado com a capacidade exploratória do animal, resultante da excitabilidade do sistema nervoso, sendo que a redução no número de rearing, é indicativo de efeito sedativo da substância em estudo (MONTEIRO, 2016). O grupo tratado com dexametasona apresentou uma redução significativa no número de levantamentos, quando comparado ao grupo tratado com salina.

O diazepam apresenta efeito ansiolítico, com resposta farmacológica mediada pelo receptor GABA_A, aumentando alostericamente sua responsividade ao GABA e consequentemente causando inibição sináptica no cérebro, no entanto em altas doses (2-3 mg/kg) provoca efeito sedativo (KUNIISHI et al., 2017; NICHOLSON et al., 2018).

Além do sistema monoaminérgico, há vários outros alvos que têm sido discutido e implicados na fisiopatologia do TDM e TA, com ênfase para o envolvimento do receptor NMDA e a via L-arginina-NO-GMPc (FREITAS et al., 2013; WORKMAN et al., 2008).

O envolvimento dos receptores NMDA na fisiopatologia da depressão vem sendo demonstrado em estudos, sendo seu bloqueio associado a uma resposta semelhante a antidepressivos (AMIDFAR et al., 2019; OSTADHADI et al., 2016). O presente estudo revelou que o antagonismo do receptor NMDA pode reduzir o tempo de imobilidade. A cetamina, um antagonista dos receptores NMDA, aumenta o efeito da dose sub-ativa de ADMP, confirmando os resultados observados no estudo *in silico*.

Drogas que inibem a sinalização do receptor N-metil-D-aspartato (NMDAR) e a via L-arginina-NO-GMPc, dependendo de suas concentrações exercem efeitos semelhantes a antidepressivos, além disso são capazes de aumentar a atividade de antidepressivos como imipramina (5 mg/kg) e fluoxetina (6,2 mg/kg) que atuam modulando o sistema serotoninérgico (HARKIN et al., 2004). No presente estudo, o tratamento com o ADMP (50 mg/kg dose efetiva), conseguiu reverter os efeitos do precursor do NO, reduzindo o tempo de imobilidade no teste de nado forçado. Além disso, não há diferença significativa entre os grupos tratados com L-arginina e dexametasona, confirmando a validade do nosso modelo.

A fim de confirmar, a hipótese de que o ADMP é dependente da atividade da NOS para apresentar efeito antidepressivo, os camundongos foram pré-tratados com uma dose ineficaz de L-NAME (10 mg/kg) combinado com o ADMP (5 mg/kg, dose ineficaz) e, verificamos que houve um efeito sinérgico, com redução no tempo de imobilidade, confirmando a ação antidepressiva via NOS, enquanto a administração única L-NAME ou ADMP (5 mg/kg) não produziu qualquer efeito.

Também investigamos se o efeito do ADMP é dependente da sGC. Observamos que a co-administração do AM (inibidor da NOS e GCs) com ADMP (5 mg/kg) não apresentou diferença significativa na redução no tempo de imobilidade, confirmando o resultado do estudo *in silico*, no qual ADMP tem melhor interação com o NMDAR e a NOS, resultante de uma menor energia de ligação, quando comparado a outros alvos.

O sistema antioxidante glutatona (GSH) é o principal mecanismo endógeno contra o estresse oxidativo no cérebro (DRINGEN, 2000), desempenhando um papel fundamental contra o estresse oxidativo, a manutenção de níveis adequados de GSH é essencial para evitar danos oxidativos ao cérebro (GAWRYLUK et al., 2011).

No organismo a glutathione existe em dois estados: reduzida (GSH) e oxidada (GSSG), a proporção de GSH para GSSG determina a condição de equilíbrio redox das células, sendo que células saudáveis em repouso apresentam uma proporção GSH/GSSG > 100, enquanto células expostas a uma condição favorável ao estresse oxidativo, essa proporção cai de 1 a 10 (PIZZORNO, 2014).

Partindo da importância da GSH para o SNC, determinamos a concentração de GSH, e então observamos que não houve redução significativa de GSH no córtex pré-frontal dos camundongos que receberam apenas dexametasona, quando comparados ao grupo controle salina. No entanto, foi observado aumento nos níveis de GSH nos animais submetidos ao tratamento com o ADMP nas doses de 25 e 100 mg/kg em comparação ao grupo tratado com dexametasona. O resultado relacionado a dexametasona pode ser explicado, de acordo com estudo realizado por Meijer e colaboradores, utilizando camundongos do tipo selvagem MDR1a (+ / +) e do tipo mutante MDR1a (- / -) para o gene MDR1a responsável por codificar a glicoproteína P, presente na membrana das células da barreira hematoencefálica e relevante no transporte de drogas, mostrou pela primeira vez que a glicoproteína P, limita o acesso da dexametasona dependendo da dose no cérebro (MEIJER et al., 1998).

Assim como o eugenol, um fenilpropanoide com estrutura similar ao ADMP, os resultados sugerem que o ADMP, pode estar atuando de maneira direta, através da captura de radicais hidroxil livres e de maneira indireta pela indução da glutathione-S-transferase, o qual é responsável pelo aumento dos níveis de glutathione reduzida e consequentemente redução do estresse oxidativo (VASCONCELOS, 2018).

Estudo recente utilizando a dexametasona para indução da depressão em ratos, verificou que, o tratamento com dexametasona (0,44 mg/kg) por 28 dias, aumentou significativamente o conteúdo plasmático de MDA e NO em 52,7 e 91,4%, respectivamente, e reduziu a capacidade antioxidante total em 53,5% em comparação ao grupo controle (ELHADIDY et al., 2019). Um outro estudo, relatou que o aumento no nível de MDA foi associado a uma diminuição do nível de glutathione reduzida pela dexametasona (ROY; SAHA; SENGUPTA, 2004).

Nossos resultados mostraram que tanto a imipramina, como o ADMP (25 e 100 mg/kg), podem ter efeitos moduladores que inibem o dano cerebral induzido pelo estresse oxidativo provenientes dos níveis alterados de glicocorticoides no organismo. Assim, nosso trabalho é corroborado por Gupta; Radhakrishnan; Kurhe, 2019, que mostraram um aumento nos níveis de malondialdeído (MDA), nitrito e redução de glutathione reduzida, evidenciando que fármacos

antagonistas do sistema serotoninérgico, glutamatérgicos, além dos que modulam o eixo HPA podem reverter o comportamento do tipo depressivo induzido por corticosterona em camundongos.

Então o presente estudo demonstrou pela primeira vez, que a administração de ADMP em camundongos submetidos ao modelo de depressão induzido por dexametasona, produziu um efeito antidepressivo e ansiolítico, sendo este associado com o envolvimento dos sistemas glutamatérgico e oxidonitrérgico.

7. CONCLUSÃO

O ADMP apresentou um efeito antidepressivo e ansiolítico-símile sendo este associado ao envolvimento dos sistemas glutamatérgico e oxidonitrérgico, baseado nos seguintes resultados obtidos:

- O ADMP não apresentou toxicidade em nenhum dos parâmetros avaliados *in silico*;
- O ADMT mostrou baixa toxicidade *in vivo*, o que permitiu realizar os experimentos, com as doses selecionadas com segurança;
- A triagem farmacológica comportamental revelou atividade depressora central na dose de 300 mg/kg.
- O ADMP não alterou a atividade locomotora dos animais;
- O ADMP promoveu efeito antidepressivo e ansiolítico-símile nos modelos comportamentais utilizados;
- O ADMP apresentou melhor interação para o receptor NMDA e a via L-arginina/NO/GMPc no estudo *in silico*;
- O mecanismo de ação do efeito antidepressivo-símile do ADMP parece envolver o antagonismo do receptor NMDA e mediadores da via L-arginina/NO/GMPc;
- O ADMP aumentou os níveis de glutathione (GSH) no córtex pré-frontal.

8. PERSPECTIVAS

O ADMP no presente estudo sugere uma atividade antidepressiva e ansiolítica-símile, embora muito ainda há para pesquisar sobre seus efeitos no tratamento do TDM e TA, bem como para outros transtornos mentais. Estudos com uma abordagem para o tratamento crônico, utilizando outras doses, considerando diferenças entre sexos, estudos de biologia molecular como expressão gênica, são algumas possibilidades, tendo em vista que é uma substância estudada pela primeira vez no âmbito do SNC.

9. REFERÊNCIAS

- AGNIHOTRI, S.; WAKODE, S.; ALI, M. Essential oil of *Myrica esculenta* Buch. Ham.: composition, antimicrobial and topical anti-inflammatory activities. **Natural product research**, v. 26, n. 23, p. 2266-2269, 2012.
- ALTSCHUL, S. F., GISH, W., MILLER, W., MYERS, E. W., LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. **Journal of molecular biology**, v. 215, n. 3, p. 403-410, 1990.
- ALMEIDA, R. N.; OLIVEIRA, T. M. L. Triagem farmacológica comportamental. In: ALMEIDA, R. N. **Psicofarmacologia: fundamentos práticos**, 1. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. cap. 11, p. 131-137, 2006.
- ALI, B., AL-WABEL, N. A., SHAMS, S., AHAMAD, A., KHAN, S. A., ANWAR, F. Essential oils used in aromatherapy: A systemic review. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 5, n. 8, p. 601-611, 2015.
- AMIDFAR, M., WOELFER, M., Reus, G. Z., QUEVEDO, J., WALTER, M., KIM, Y. K. The role of NMDA receptor in neurobiology and treatment of major depressive disorder: evidence from translational research. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 94, p. 109668, 2019.
- ANDRADE, H. H. N. **Estudo não clínico do perfil psicofarmacológico do álcool cinâmico**. 2019. 86 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Programa de Pós-Graduação em Neurociência Cognitiva e Comportamento, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2019.
- ARAÚJO, A. N. V. de. **Investigação da atividade antidepressiva do orto Eugenol em modelos comportamentais de depressão induzidos por dexametasona**. 2018. 84 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Programa de Pós-Graduação em Neurociência Cognitiva e Comportamento, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2018.
- EISA, S.G.A.A.; HASSAN, M. K; HAMID, N.M. A.; AHMED, A. Evaluation of the acute hepatotoxicity of *Medemia argun* seed's extract by determining of LD50 value and dose response curve. **Alfarama Journal of Basic & Applied Sciences**, 2020.
- AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. **DSM-5: Manual diagnóstico e estatístico de transtornos mentais**. Artmed Editora, 2014.
- ABELAIRA, H. M.; REUS, G. Z.; QUEVEDO, J. Animal models as tools to study the pathophysiology of depression. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 35, p. S112-S120, 2013.
- ADWAS, A. A.; JBIREAL, J. M.; AZAB, A. E. Anxiety: Insights into Signs, Symptoms, Etiology, Pathophysiology, and Treatment. **East African Scholars Journal of Medical Sciences**, v. 2, n. October, p. 80-91, 2019.
- BAHMANI, M., SAKI, K., RAFIEIAN-KOPAELI, M., KARAMATI, S. A., EFTEKHARI, Z., JELODARI, M. The most common herbal medicines affecting *Sarcomastigophora* branches: A review study. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 7, n. S1, p. S14-S21, 2014.
- BAKUNINA, N.; PARIANTE, C. M.; ZUNSZAIN, P. A. Immune mechanisms linked to depression via oxidative stress and neuroprogression. **Immunology**, v. 144, n. 3, p. 365-373, 2015.
- BALAKRISHNAN, N.; RAJ, J. S.; KANDAKATLA, N. In silico studies on new Indazole

derivatives as GSK-3 β inhibitors. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 7, n. 3, p. 295–299, 2015.

BALDWIN, D. S., ANDERSON, I. M., NUTT, D. J., ALLGULANDER, C., BANDELOW, B., DEN BOER, J. A., WITTCHEN, H. U. Evidence-based pharmacological treatment of anxiety disorders, post-traumatic stress disorder and obsessive-compulsive disorder: a revision of the 2005 guidelines from the British Association for Psychopharmacology. **Journal of psychopharmacology (Oxford, England)**, v. 28, n. 5, p. 403–39, 2014.

BABAEV, O.; CHATAIN, C. P.; KRUEGER-BURG, D. Inhibition in the amygdala anxiety circuitry. **Experimental & molecular medicine**, v. 50, n. 4, p. 1-16, 2018.

BATHINA, S.; DAS, U. N. Brain-derived neurotrophic factor and its clinical Implications. **Archives of Medical Science**, v. 11, n. 6, p. 1164–1178, 2015.

BEITCHMAN, J. A., GRIFFITHS, D. R., HUR, Y., OGLE, S. B., BROMBERG, C. E., MORRISON, H. W., THOMAS, T. C. Experimental Traumatic Brain Injury Induces Chronic Glutamatergic Dysfunction in Amygdala Circuitry Known to Regulate Anxiety-Like Behavior. **Frontiers in Neuroscience**, v. 13, n. January, p. 1–20, 2020.

BEKTAS, N.; ARSLAN, R.; ALYU, F. The anxiolytic effect of perampanel and possible mechanisms mediating its anxiolytic effect in mice. **Life Sciences**, v. 261, n. August, p. 118359, 2020.

BEYTUT, E., YILMAZ, S., AKSAKAL, M., POLAT, S. The possible protective effects of vitamin E and selenium administration in oxidative stress caused by high doses of glucocorticoid administration in the brain of rats. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 45, n. April 2017, p. 131–135, 2018.

BHATT, S.; NAGAPPA, A. N.; PATIL, C. R. Role of oxidative stress in depression. **Drug Discovery Today**, v. 25, n. 7, p. 1270–1276, 2020.

BLACK, C. N., BOT, M., SCHEFFER, P. G., CUIJPERS, P., PENNINX, B. W. Is depression associated with increased oxidative stress? A systematic review and meta-analysis. **Psychoneuroendocrinology**, v. 51, p. 164–175, 2015.

BLEAKLEY, Stephen; DAVIES, Simon JC. The pharmacological management of anxiety disorders. **Progress in Neurology and Psychiatry**, v. 18, n. 6, p. 27-32, 2014.

BOURIN, M. Animal models for screening anxiolytic-like drugs: A perspective. **Dialogues in Clinical Neuroscience**, v. 17, n. 3, p. 295–303, 2015.

BRAGA, J. E. F. Ansiedade Patológica: Bases Neurais E Avanços Na Abordagem Psicofarmacológica. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, v. 14, n. 2, p. 93–100, 2010.

BURGESE, D. F.; BASSITT, D. P. Variation of plasma cortisol levels in patients with depression after treatment with bilateral electroconvulsive therapy. **Trends in Psychiatry and Psychotherapy**, v. 37, n. 1, p. 27–36, 2015.

BURUCK, G., PFARR, A. L., PENZ, M., WEKENBORG, M., ROTHE, N., WALTHER, A. The Influence of Workload and Work Flexibility on Work-Life Conflict and the Role of Emotional Exhaustion. **Behavioral Sciences**, v. 10, n. 11, p. 174, 2020.

CAMPOS, A. C., FOGAÇA, M. V., AGUIAR, D. C., GUIMARAES, F. S. Animal models of anxiety disorders and stress. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 35, n. SUPPL.2, p. 101–111, 2013.

- CANET, G., CHEVALLIER, N., ZUSSY, C., DESRUMAUX, C., GIVALOIS, L. Central role of glucocorticoid receptors in Alzheimer's disease and depression. **Frontiers in Neuroscience**, v. 12, n. OCT, p. 1–9, 2018.
- CARVALHO, A. A., ANDRADE, L. N., DE SOUSA, É. B. V., DE SOUSA, D. P. Antitumor Phenylpropanoids Found in Essential Oils. **BioMed Research International**, v. 2014, 2014.
- CHAUDHARI, U. P., TRIVEDI, N. D., PATIL, R.R., BANERJEE, S. Molecular docking studies of l-name with the neuronal nitric oxide synthase. **International Journal of ChemTech Research**, v. 2, n. 1, p. 122–128, 2010.
- CHEN, D., OEZGUEN, N., URVIL, P., FERGUSON, C., DANN, S. M., SAVIDGE, T. C. Regulation of protein-ligand binding affinity by hydrogen bond pairing. **Science Advances**, v. 2, n. 3, 2016.
- CHEN, H. J. C., SPIERS, J. G., SERNIA, C., LAVIDIS, N. A. Response of the nitrenergic system to activation of the neuroendocrine stress axis. **Frontiers in Neuroscience**, v. 9, n. JAN, p. 1–7, 2015.
- CLEARE, A., PARIANTE, C. M., YOUNG, A. H., ANDERSON, I. M., CHRISTMAS, D., COWEN, P. J. Evidence-based guidelines for treating depressive disorders with antidepressants: a revision of the 2008 British Association for Psychopharmacology guidelines. **Journal of Psychopharmacology**, v. 29, n. 5, p. 459-525, 2015.
- CROWE, M., INDER, M., DOUGLAS, K., CARLYLE, D., WELLS, H., JORDAN, J., PORTER, R. Interpersonal and social rhythm therapy for patients with major depressive disorder. **American journal of psychotherapy**, v. 73, n. 1, p. 29-34, 2020.
- CHOPRA, K.; KUMAR, B.; KUHAD, A. Pathobiological targets of depression. **Expert opinion on therapeutic targets**, v. 15, n. 4, p. 379-400, 2011.
- CONTI, M., SPULBER, S., RACITI, M., CECCATELLI, S. Depressive-like phenotype induced by prenatal dexamethasone in mice is reversed by desipramine. **Neuropharmacology**, v. 126, p. 242–249, 2017.
- CRUPI, R., MAZZON, E., MARINO, A., LA SPADA, G., BRAMANTI, P., CUZZOCREA, S., SPINA, E. Melatonin treatment mimics the antidepressant action in chronic corticosterone-treated mice. **Journal of Pineal Research**, v. 49, n. 2, p. 123–129, 2010.
- DA SILVA CALIXTO, P., DE ALMEIDA, R. N., STIEBBE SALVADORI, M. G., DOS SANTOS MAIA, M., SCOTTI, M. T., SCOTTI, L. In silico study examining new phenylpropanoids targets with antidepressant activity. **Current Drug Targets**, v. 21, p. 1–16, 2020.
- DANG, Y. H., MA, X. C., ZHANG, J. C., REN, Q., WU, J., GAO, C. G., HASHIMOTO, K. Targeting of NMDA Receptors in the Treatment of Major Depression. **Current Pharmaceutical Design**, v. 20, n. 32, p. 5151–5159, 2014.
- DANTSUJI, M., NAKAMURA, S., NAKAYAMA, K., MOCHIZUKI, A., PARK, S. K., BAE, Y. C., INOUE, T. 5-HT 2A receptor activation enhances NMDA receptor-mediated glutamate responses through Src kinase in the dendrites of rat jaw-closing motoneurons. **Journal of Physiology**, v. 597, n. 9, p. 2565–2589, 2019.
- DARCET, F., GARDIER, A. M., GAILLARD, R., DAVID, D. J., & GUILLOUX, J. P. Cognitive dysfunction in major depressive disorder. A translational review in animal models of the disease. **Pharmaceuticals**, v. 9, n. 1, p. 9, 2016.

DAVID, D. J., SAMUELS, B. A., RAINER, Q., WANG, J. W., MARSTELLER, D., MENDEZ, I., HEN, R. Neurogenesis-dependent and-independent effects of fluoxetine in an animal model of anxiety/depression. **Neuron**, v. 62, n. 4, p. 479-493, 2009.

DE ALMEIDA, R. N, FALCÃO, A. C. G.M., DINIZ, R. S. T., JÚNIOR, L. J.Q., POLARI, R. M. FILHO, J.M.B. AGRA, M. F., DUARTE, J. C., FERREIRA, C.D., ANTONIOLLI, A. R., ARAÚJO, C. C. Metodologia para avaliacao de plantas com atividade no Sistema Nervoso Central e alguns dados experimentais. **Revista Brasileira de Farmacia**, v. 80, n. 3-4, p. 72-76, 1999.

DE ANDRADE, H. H. N., MONTEIRO, Á. B., BRAGA, R. M., DA CRUZ, R. M. D., SALVADORI, M. G. D. S. S., SCOTTI, M. T., DE ALMEIDA, R. N. Anxiolytic and antinociceptive-like effects of cinnamic alcohol by possible GABAergic pathway modulation: In vivo and in silico studies. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 7, p. 51372-51389, 2020.

DESHMUKH, R., KAUNDAL, M., BANSAL, V., SAMARDEEP. Caffeic acid attenuates oxidative stress, learning and memory deficit in intra-cerebroventricular streptozotocin induced experimental dementia in rats. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 81, p. 56-62, 2016.

LOPES, I. S., OLIVEIRA, I. C. M., CAPIBARIBE, V. C. C., VALENTIM, J. T., DA SILVA, D. M. A., DE SOUZA, A. G., DE SOUSA, F. C. F. Riparin II ameliorates corticosterone-induced depressive-like behavior in mice: Role of antioxidant and neurotrophic mechanisms. **Neurochemistry International**, v. 120, n. July, p. 33-42, 2018.

DELL'OSSO, B., PALAZZO, M. C., OLDANI, L., ALTAMURA, A. C. The noradrenergic action in antidepressant treatments: pharmacological and clinical aspects. **CNS neuroscience & therapeutics**, v. 17, n. 6, p. 723-732, 2011.

OLIVEIRA-SILVA, J. A. D., YAMAMOTO, J. U. P., OLIVEIRA, R. B. D., MONTEIRO, V. C. L., FRANGIPANI, B. J., KYOSEN, S. O., D'ALMEIDA, V. Oxidative stress assessment by glutathione peroxidase activity and glutathione levels in response to selenium supplementation in patients with mucopolysaccharidosis I, II and VI. **Genetics and Molecular Biology**, v. 42, n. 1, p. 1-8, 2019.

DE SOUZA, I. B., COSTA, L. R., TIAGO, P. R., CAGNI, F. C., LIMA, R. H., SILVA JUNIOR, E. D., GAVIOLI, E. C. Venlafaxine and Nortriptyline Reverse Acute Dexamethasone-Induced Depressive-Like Behaviors in Male and Female Mice. **Experimental and Clinical Psychopharmacology**, v. 27, n. 5, p. 433-442, 2019.

DE SOUZA, I. M.; MACHADO-DE-SOUSA, J. P. Brazil: World leader in anxiety and depression rates. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 39, n. 4, p. 384, 2017.

DE SOUSA, D. P., SILVA, R. H., SILVA, E. F. D., GAVIOLI, E. C. Essential oils and their constituents: an alternative source for novel antidepressants. **Molecules**, v. 22, n. 8, p. 1290, 2017.

DELPORT, A., HARVEY, B. H., PETZER, A., PETZER, J. P. Methylene blue and its analogues as antidepressant compounds. **Metabolic Brain Disease**, v. 32, n. 5, p. 1357-1382, 2017.

DEMORROW, S. Role of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in health and disease. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 4, 2018.

DONG, C.; WONG, M. L.; LICINIO, J. Sequence variations of ABCB1, SLC6A2, SLC6A3, SLC6A4, CREB1, CRHR1 and NTRK2: Association with major depression and antidepressant response in Mexican-Americans. **Molecular Psychiatry**, v. 14, n. 12, p. 1105–1118, 2009.

DOUKKALI, Z., KAMAL, R., JEMELI, M. E., NADJMOUDDINE, M., ZELLOU, A., CHERRAH, Y., ALAOUI, K., TAGHZOUTI, K. Anti-Anxiety Effects of *Mercurialis Annua* Aqueous Extract in the Elevated Plus Maze Test. **Pharmaceutical Bioprocessing**, v. 4, n. 4, p. 056–061, 2016.

DUNCAN, J.; JOHNSON, S.; OU, X. M. Monoamine oxidases in major depressive disorder and alcoholism. **Drug discoveries & therapeutics**, v. 6, n. 3, p. 112–122, 2012.

EFSA PANEL ON ADDITIVES AND PRODUCTS OR SUBSTANCES USED IN ANIMAL FEED (FEEDAP). Scientific Opinion on the safety and efficacy of allylhydroxybenzenes (chemical group 18) when used as flavourings for all animal species. **EFSA Journal**, v. 9, n. 12, p. 2440, 2011.

ELHADIDY, M. E., SALAMA, A. A., EL-KASSABY, M., OMARA, E. A. Protective effect of *Hypericum perforatum* on dexamethasone-induced diabetic depression in rats. **Journal of The Arab Society for Medical Research**, v. 14, n. 1, p. 25, 2019.

FASIPE, O. J. Neuropharmacological classification of antidepressant agents based on their mechanisms of action. **Archives of Medicine and Health Sciences**, v. 6, n. 1, p. 81, 2018.

FAJEMIROYE, J. O., GALDINO, P. M., DE PAULA, J. A. M., ROCHA, F. F., AKANMU, M. A., VANDERLINDE, F. A., COSTA, E. A. Anxiolytic and antidepressant like effects of natural food flavour (E)-methyl isoeugenol. **Food and Function**, v. 5, n. 8, p. 1819–1828, 2014.

FARACH, F. J., PRUITT, L. D., JUN, J. J., JERUD, A. B., ZOELLNER, L. A., & ROY-BYRNE, P. P. Pharmacological treatment of anxiety disorders: Current treatments and future directions. **Journal of Anxiety Disorders**, v. 26, n. 8, p. 833–843, 2012.

FASIPE, O. J. The emergence of new antidepressants for clinical use: Agomelatine paradox versus other novel agents. **IBRO Reports**, v. 6, n. January, p. 95–110, 2019.

FERRARI, A. J., CHARLSON, F. J., NORMAN, R. E., PATTEN, S. B., FREEDMAN, G., MURRAY, C. J., WHITEFORD, H. A. Burden of Depressive Disorders by Country, Sex, Age, and Year: Findings from the Global Burden of Disease Study 2010. **PLoS Medicine**, v. 10, n. 11, 2013.

FIETTA, P.; FIETTA, P.; DELSANTE, G. Central nervous system effects of natural and synthetic glucocorticoids: **Psychiatry and Clinical Neurosciences**, v. 63, n. 5, p. 613–622, 2009.

FIRMO, W. D. C. A., DE MENEZES, V. D. J. M., DE CASTRO PASSOS, C. E., DIAS, C. N., ALVES, L. P. L., DIAS, I. C. L., OLEA, R. S. G. Contexto histórico, uso popular e concepção científica sobre plantas medicinais. **Cad. Pesq.**, v. 18, n. n. especial, p. 90–95, 2011.

FREITAS, A. E., MORETTI, M., BUDNI, J., BALEN, G. O., FERNANDES, S. C., VERONEZI, P. O., RODRIGUES, A. L. S. NMDA receptors and the l-arginine-nitric oxide-cyclic guanosine monophosphate pathway are implicated in the antidepressant-like action of the ethanolic extract from *tabebuia avellaneda* in mice. **Journal of Medicinal Food**, v. 16, n. 11, p. 1030–1038, 2013.

FURUKAWA, T. A., SALANTI, G., ATKINSON, L. Z., LEUCHT, S., RUHE, H. G., TURNER, E. H., CIPRIANI, A. Comparative efficacy and acceptability of first-generation and second-generation antidepressants in the acute treatment of major depression: protocol for a network meta-analysis. **BMJ open**, v. 6, n. 7, p. e010919, 2016.

GAMAGE, N., SENANAYAKE, S., KUMBUKAGE, M., MENDIS, J., JAYASEKARA, A. The prevalence of anxiety and its association with the quality of life and illness severity among bipolar affective disorder patients in a developing country. **Asian Journal of Psychiatry**, v. 52, n. March, p. 102044, 2020.

GARCIA-MIRALLES, M., OOI, J., BARDILE, C. F., TAN, L. J., GEORGE, M., DRUM, C. L., POULADI, M. A. Treatment with the MAO-A inhibitor clorgyline elevates monoamine neurotransmitter levels and improves affective phenotypes in a mouse model of Huntington disease. **Experimental Neurology**, v. 278, p. 4–10, 2016.

GANDHI, S. G.; MAHAJAN, V.; BEDI, Y. S. Changing trends in biotechnology of secondary metabolism in medicinal and aromatic plants. **Planta**, v. 241, n. 2, p. 303–317, 2015.

GARTLEHNER, G., HANSEN, R. A., MORGAN, L. C., THALER, K., LUX, L., VAN NOORD, M., LOHR, K. N. Comparative Benefits and Harms of Second-Generation Antidepressants for Treating Major Depressive Disorder. An Updated Meta-Analysis. **Annals of Internal Medicine**, v. 155, n. 16, p. 772–785, 2011.

GAWRYLUK, J. W., WANG, J. F., ANDREAZZA, A. C., SHAO, L., YOUNG, L. T. Decreased levels of glutathione, the major brain antioxidant, in post-mortem prefrontal cortex from patients with psychiatric disorders. **International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 14, n. 1, p. 123–130, 2011.

GOODWIN, G. M. The overlap between anxiety, depression, and obsessive-compulsive disorder. **Dialogues in Clinical Neuroscience**, v. 17, n. 3, p. 249–260, 2015.

GROEN, R. N., RYAN, O., WIGMAN, J. T., RIESE, H., PENNINX, B. W., GILTAY, E. J., HARTMAN, C. A. Comorbidity between depression and anxiety: Assessing the role of bridge mental states in dynamic psychological networks. **BMC Medicine**, v. 18, n. 1, p. 1–17, 2020.

GROTTO, D., MARIA, L. S., VALENTINI, J., PANIZ, C., SCHMITT, G., GARCIA, S. C., FARINA, M. Importance of the lipid peroxidation biomarkers and methodological aspects for malondialdehyde quantification. **Quimica Nova**, v. 32, n. 1, p. 169–174, 2009.

GOURLEY, S. L.; WU, F. J.; TAYLOR, J. R. Corticosterone regulates pERK1/2 map kinase in a chronic depression model. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1148, p. 509, 2008.

GUTTERIDGE, J. M. C.; HALLIWELL, B. Mini-Review: Oxidative stress, redox stress or redox success? **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 502, n. 2, p. 183–186, 2018.

GÜLOĞLU, C., ORAK, M., ÜSTÜNDAĞ, M., ALTUNCI, Y. A. Analysis of amitriptyline overdose in emergency medicine. **Emergency Medicine Journal**, v. 28, n. 4, p. 296–299, 2011.

HALL, H.; ÖGREN, S. Effects of antidepressant drugs on histamine-H1 receptors in the brain. **Life sciences**, v. 34, n. 6, p. 597–605, 1984.

HARKIN, A., CONNOR, T. J., BURNS, M. P., KELLY, J. P. Nitric oxide synthase inhibitors augment the effects of serotonin re-uptake inhibitors in the forced swimming test. **European**

Neuropsychopharmacology, v. 14, n. 4, p. 274–281, 2004.

HARVEY, B. H., RETIEF, R., KORFF, A., WEGENER, G. Increased hippocampal nitric oxide synthase activity and stress responsiveness after imipramine discontinuation: role of 5HT 2A/C-receptors. **Metabolic brain disease**, v. 21, n. 2, p. 201-210, 2006.

HARRIS, C., WEISS, G. L., DI, S., TASKER, J. G. Cell signaling dependence of rapid glucocorticoid-induced endocannabinoid synthesis in hypothalamic neuroendocrine cells. **Neurobiology of Stress**, v. 10, n. December 2018, 2019.

HASHIMOTO, K. Ketamine's antidepressant action: beyond NMDA receptor inhibition. **Expert Opinion on Therapeutic Targets**, v. 20, n. 11, p. 1389–1392, 2016.

HASSAN, M. A. M., GAD, A. M., MENZE, E. T., BADARY, O. A., EL-NAGA, R. N. Protective effects of morin against depressive-like behavior prompted by chronic unpredictable mild stress in rats: Possible role of inflammasome-related pathways. **Biochemical Pharmacology**, v. 180, n. May, p. 114140, 2020.

HECK, S. O., ZBOROWSKI, V. A., PINTON, S., NOGUEIRA, C. W. Pro-apoptotic cell signaling in the prefrontal cortex contributes to depressive-/anxiogenic-like behavioral phenotype of mice subchronically exposed to dexamethasone. **Journal of chemical neuroanatomy**, v. 100, p. 101663, 2019.

HERMAN, J. P., MCKLVEEN, J. M., GHOSAL, S., KOPP, B., WULSIN, A., MAKINSON, R., MYERS, B. Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical stress response. **Comprehensive Physiology**, v. 6, n. 2, p. 603-621, 2016.

HERPERTZ, S., HAGENAH, U., VOCKS, S., VON WIETERSHEIM, J., CUNTZ, U., ZEECK, A. The diagnosis and treatment of eating disorders. **Deutsches Ärzteblatt International**, v. 108, n. 40, p. 678–85, 2011.

HUANG, D., ZHANG, L., YANG, J. Q., LUO, Y., CUI, T., DU, T. T., JIANG, X. H. Evaluation on monoamine neurotransmitters changes in depression rats given with sertraline, meloxicam or/and caffeic acid. **Genes & diseases**, v. 6, n. 2, p. 167-175, 2019.

HUFFMAN, J. C.; CELANO, C. M.; JANUZZI, J. L. The relationship between depression, anxiety, and cardiovascular outcomes in patients with acute coronary syndromes. **Neuropsychiatric disease and treatment**, v. 6, p. 123–36, 2010.

HYLDGAARD, M.; MYGIND, T.; MEYER, R. L. Essential oils in food preservation: Mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, n. JAN, p. 1–24, 2012.

ILIJEVA, R.; BUCHBAUER, G. Biological Properties of Some Volatile Phenylpropanoids. **Natural Product Communications**, v. 11, n. 10, p. 1934578X1601101, 2016.

IOB, E.; KIRSCHBAUM, C.; STEPTOE, A. Persistent depressive symptoms, HPA-axis hyperactivity, and inflammation: the role of cognitive-affective and somatic symptoms. **Molecular Psychiatry**, v. 25, n. 5, p. 1130–1140, 2020.

IONESCU, D. F., NICIU, M. J., RICHARDS, E. M., ZARATE JR, C. A. Pharmacologic treatment of dimensional anxious depression: a review. **The primary care companion to CNS disorders**, v. 16, n. 3, p. 1–20, 2014.

IOANNOU, N., LIAPI, C., SEKERIS, C. E., PALAIOLOGOS, G. Effects of dexamethasone on K⁺-evoked glutamate release from rat hippocampal slices. **Neurochemical research**, v. 28, n. 6, p. 875-881, 2003.

IRIE, Y., ITOKAZU, N., ANJIKI, N., ISHIGE, A., WATANABE, K., KEUNG, W. M. Eugenol exhibits antidepressant-like activity in mice and induces expression of metallothionein-III in the hippocampus. **Brain Research**, v. 1011, n. 2, p. 243–246, 2004.

IRWIN, M. R.; COLE, S. W. Reciprocal regulation of the neural and innate immune systems. **Nature Reviews Immunology**, v. 11, n. 9, p. 625-632, 2011.

JAMES, S. L., ABATE, D., ABATE, K. H., ABAY, S. M., ABBAFATI, C., ABBASI, N., BRIGGS, A. M. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 354 Diseases and Injuries for 195 countries and territories, 1990-2017: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. **The Lancet**, v. 392, n. 10159, p. 1789–1858, 2018.

JESULOLA, E.; MICALOS, P.; BAGULEY, I. J. Understanding the pathophysiology of depression: From monoamines to the neurogenesis hypothesis model - are we there yet? **Behavioural Brain Research**, v. 341, n. November 2017, p. 79–90, 2018.

JIANG, T., HU, S., DAI, S., YI, Y., WANG, T., LI, X., XU, D. Programming changes of hippocampal miR-134-5p/SOX2 signal mediate the susceptibility to depression in prenatal dexamethasone-exposed female offspring. **Cell Biology and Toxicology**, p. 1-18, 2021.

JOCA, S. R., SARTIM, A. G., RONCALHO, A. L., DINIZ, C. F., WEGENER, G. Nitric oxide signalling and antidepressant action revisited. **Cell and Tissue Research**, v. 377, n. 1, p. 45–58, 2019.

JUDD, L. L., SCHETTLER, P. J., BROWN, E. S., WOLKOWITZ, O. M., STERNBERG, E. M., BENDER, B. G., SINGH, G. Adverse consequences of glucocorticoid medication: Psychological, cognitive, and behavioral effects. **American Journal of Psychiatry**, v. 171, n. 10, p. 1045–1051, 2014.

KALUEFF, A. V., STEWART, A. M., SONG, C., GOTTESMAN, I. I. Neuroscience and Biobehavioral Reviews Targeting dynamic interplay among disordered domains or endophenotypes to understand complex neuropsychiatric disorders : Translational lessons from preclinical models. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 53, p. 25–36, 2015.

KAMDEM, D. P.; GAGE, D. A. Chemical composition of essential oil from the root bark of *Sassafras albidum*. **Planta medica**, v. 61, n. 06, p. 574-575, 1995.

KAUR, S.; SINGH, R. Role of different neurotransmitters in anxiety: A systemic review. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 8, n. 2, p. 411–421, 2017.

KALINOVA, J.; TRISKA, J.; VRCHOTOVA, N. Occurrence of eugenol, coniferyl alcohol and 3, 4, 5-trimethoxyphenol in common buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) and their biological activity. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 33, n. 5, p. 1679-1685, 2011.

KEIL, M. F. et al. Protein Kinase A and Anxiety-Related Behaviors: A Mini-Review. **Frontiers in endocrinology**, v. 7, n. June, p. 83, 2016.

KESSLER, R. C.; BROMET, E. J. The epidemiology of depression across cultures. **Annual review of public health**, v. 34, p. 119-138, 2013.

- KHUSHBOO, S. B.; SHARMA, B. Antidepressants: mechanism of action, toxicity and possible amelioration. **J. Appl. Biotechnol. Bioeng**, v. 3, p. 1-13, 2017.
- KISHI, T., YOSHIMURA, R., IKUTA, T., IWATA, N. Brain-derived neurotrophic factor and major depressive disorder: Evidence from meta-analyses. **Frontiers in Psychiatry**, v. 8, n. JAN, p. 1–5, 2018.
- KUMARI, S., PUNDIR, S., PRIYA, P., JEENA, G., PUNETHA, A., CHAWLA, K., YADAV, G. EssOilDB: A database of essential oils reflecting terpene composition and variability in the plant kingdom. **Database**, v. 2014, p. 1–12, 2014.
- KUNIISHI, H., ICHISAKA, S., YAMAMOTO, M., IKUBO, N., MATSUDA, S., FUTORA, E., HATA, Y. Early deprivation increases high-leaving behavior, a novel anxiety-like behavior, in the open field test in rats. **Neuroscience Research**, v. 123, p. 27-35, 2017.
- KUPFERBERG, A.; BICKS, L.; HASLER, G. Social functioning in major depressive disorder. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 69, p. 313-332, 2016.
- LEE, B., SHIM, I., LEE, H. J., YANG, Y., HAHM, D. H. Effects of acupuncture on chronic corticosterone-induced depression-like behavior and expression of neuropeptide Y in the rats. **Neuroscience Letters**, v. 453, n. 3, p. 151–156, 2009.
- LEE, G.; BAE, H. Therapeutic effects of phytochemicals and medicinal herbs on depression. **BioMed research international**, v. 2017, 2017.
- LINDER, A., GERDTHAM, U. G., TRYGG, N., FRITZELL, S., SAHA, S. Inequalities in the economic consequences of depression and anxiety in Europe: a systematic scoping review. **European journal of public health**, v. 30, n. 4, p. 767-777, 2020.
- LI, S. X., FUJITA, Y., ZHANG, J. C., REN, Q., ISHIMA, T., WU, J., HASHIMOTO, K. 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**, v. 62, p. 124–134, 2014.
- LISTER, R. G. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. **Psychopharmacology**, v. 92, n. 2, p. 180–185, 1987.
- LÓPEZ, V., GERIQUE, J., LANGA, E., BERZOSA, C., VALERO, M. S., GÓMEZ-RINCÓN, C. Antihelminthic effects of nutmeg (*Myristica fragans*) on *Anisakis simplex* L3 larvae obtained from *Micromesistius potassou*. **Research in veterinary science**, v. 100, p. 148-152, 2015.
- LUO, P.; HE, G. F.; LIU, D. HCN channels: New targets for the design of an antidepressant with rapid effects. **Journal of Affective Disorders**, v. 245, n. November 2018, p. 764–770, 2019.
- MACCALLINI, C.; AMOROSO, R. Targeting neuronal nitric oxide synthase as a valuable strategy for the therapy of neurological disorders. **Neural Regeneration Research**, v. 11, n. 11, p. 1731–1734, 2016.
- MADALENA, K. M.; LERCH, J. K. The effect of glucocorticoid and glucocorticoid receptor interactions on brain, spinal cord, and glial cell plasticity. **Neural Plasticity**, v. 2017, 2017.
- MADONNA, D., DELVECCHIO, G., SOARES, J. C., BRAMBILLA, P. Structural and functional neuroimaging studies in generalized anxiety disorder: A systematic review. **Brazilian Journal of Psychiatry**, v. 41, n. 4, p. 336–362, 2019.

MAGGIONI, D. C., SCOLARO, L. L., JUNIOR, S. E. M., MELLA, E. A. C. Levantamento do consumo de antidepressivos em um município do oeste de santa catarina survey of antidepressant consumption in a town in western of santa catarina state , **BRAZIL**. p. 55–62, 2008.

MARCHAND, W. R., LEE, J. N., JOHNSON, S., THATCHER, J., GALE, P., WOOD, N., JEONG, E. K. Striatal and cortical midline circuits in major depression: Implications for suicide and symptom expression. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 36, n. 2, p. 290–299, 2012.

MATTHEWS, P. RL; HORDER, J.; PEARCE, M. Selective noradrenaline reuptake inhibitors for schizophrenia. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, n. 1, 2018.

MCCALL, J. G., AL-HASANI, R., SIUDA, E. R., HONG, D. Y., NORRIS, A. J., FORD, C. P., & BRUCHAS, M. R. CRH Engagement of the Locus Coeruleus Noradrenergic System Mediates Stress-Induced Anxiety. **Neuron**, v. 87, n. 3, p. 605–620, 2015.

MCEWEN, B. S.; NASCA, C.; GRAY, J. D. Stress Effects on Neuronal Structure: Hippocampus, Amygdala, and Prefrontal Cortex. **Neuropsychopharmacology**, v. 41, n. 1, p. 3–23, 2016.

MECHANISM, A P.; MIGRAINE, D. 5-HT 2A Receptor Activation and Nitric Oxide Synthesis : p. 566–574, 2002.

MEIJER, O. C., DE LANGE, E. C. M., BREIMER, D. D., DE BOER, A. G., WORKEL, J. O., & DE KLOET, E. R. Penetration of dexamethasone into brain glucocorticoid targets is enhanced in mdr1A P-glycoprotein knockout mice. **Endocrinology**, v. 139, n. 4, p. 1789–1793, 1998.

MILLER, A. H.; RAISON, C. L. Role of inflammation in depression. **Nat Rev Immunol**, v. 16, n. 1, p. 22–34, 2017.

MIRKOVIC, B., LAURENT, C., PODLIPSKI, M. A., FREBOURG, T., COHEN, D., GERARDIN, P. Genetic association studies of suicidal behavior: A review of the past 10 years, progress, limitations, and future directions. **Frontiers in Psychiatry**, v. 7, n. SEP, 2016.

MAEDA, A., TANIMOTO, S., ABE, T., KAZAMA, S., TANIZAWA, H., NOMURA, M. Chemical constituents of Myristica fragrans Houttuyn seed and their physiological activities. **Yakugaku Zasshi: Journal of the Pharmaceutical Society of Japan**, v. 128, n. 1, p. 129–133, 2008.

MONTEIRO, Á. B. **DETERMINAÇÃO DO PERFIL FITOQUÍMICO E DO EFEITO ANTIDEPRESSIVO-SÍMILE DO EXTRATO HIDROETANÓLICO DAS FOLHAS DA Annona coriacea Mart. E ÁCIDO CAFÉICO EM CAMUNDONGOS E SEU POSSÍVEL MECANISMO DE AÇÃO**. 2016. 211 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Programa de Pósgraduação em Bioprospecção Molecular, Universidade Regional do Cariri - Urca, Crato, 2016.

MORACZEWSKI, J.; AEDMA, K. K. Tricyclic Antidepressants. **StatPearls [Internet]**, 2020.

MUNIZ, D. F., DOS SANTOS BARBOSA, C. R., DE MENEZES, I. R. A., DE SOUSA, E. O., PEREIRA, R. L. S., JÚNIOR, J. T. C., TINTINO, S. R. In vitro and in silico inhibitory effects of synthetic and natural eugenol derivatives against the NorA efflux pump in *Staphylococcus aureus*. **Food Chemistry**, v. 337, p. 127776, 2021.

- NAGANO, M., LIU, M., INAGAKI, H., KAWADA, T., SUZUKI, H. Early intervention with fluoxetine reverses abnormalities in the serotonergic system and behavior of rats exposed prenatally to dexamethasone. **Neuropharmacology**, v. 63, n. 2, p. 292-300, 2012.
- NESTLER, E. J., BARROT, M., DILEONE, R. J., EISCH, A. J., GOLD, S. J., MONTEGGIA, L. M. Neurobiology of depression. **Neuron**, v. 34, n. 1, p. 13-25, 2002.
- NEWBY, J. M., MCKINNON, A., KUYKEN, W., GILBODY, S., DALGLEISH, T. Systematic review and meta-analysis of transdiagnostic psychological treatments for anxiety and depressive disorders in adulthood. **Clinical Psychology Review**, v. 40, p. 91-110, 2015.
- NGUYEN, E. T., CALDWELL, J. L., STREICHER, J., GHISAYS, V., BALMER, N. J., ESTRADA, C. M., SOLOMON, M. B. Differential effects of imipramine and CORT 118335 (Glucocorticoid receptor modulator/mineralocorticoid receptor antagonist) on brain-endocrine stress responses and depression-like behavior in female rats. **Behavioural Brain Research**, v. 336, n. September 2017, p. 99-110, 2018.
- NICHOLSON, M. W., SWEENEY, A., PEKLE, E., ALAM, S., ALI, A. B., DUCHEN, M., & JOVANOVIC, J. N. Diazepam-induced loss of inhibitory synapses mediated by PLC δ /Ca²⁺/calcineurin signalling downstream of GABAA receptors. **Molecular Psychiatry**, v. 23, n. 9, p. 1851-1867, 2018.
- NUSS, P. Anxiety disorders and GABA neurotransmission: A disturbance of modulation. **Neuropsychiatric Disease and Treatment**, v. 11, p. 165-175, 2015.
- NUNES, E. A.; HALLAK, Jaime Eduardo Cecílio. Modelos animais em psiquiatria: avanços e desafios. **Revista latinoamericana de psicopatologia fundamental**, v. 17, n. 3, p. 528-543, 2014.
- O'CONNOR, D. B., GREEN, J. A., FERGUSON, E., O'CARROLL, R. E., O'CONNOR, R. C. Cortisol reactivity and suicidal behavior: Investigating the role of hypothalamic-pituitary-adrenal axis responses to stress in suicide attempters and ideators. **Psychoneuroendocrinology**, v. 75, p. 183-191, 2017.
- OLIVIER, J. D. A., BLOM, T., ARENTSEN, T., HOMBERG, J. R. The age-dependent effects of selective serotonin reuptake inhibitors in humans and rodents: A review. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 35, n. 6, p. 1400-1408, 2011.
- OPITZ, S.; NES, W. D.; GERSHENZON, J. Both methylerythritol phosphate and mevalonate pathways contribute to biosynthesis of each of the major isoprenoid classes in young cotton seedlings. **Phytochemistry**, v. 98, p. 110-119, 2014.
- DO CARMO, M. B. O., MENDES-RIBEIRO, A. C., MATSUURA, C., PINTO, V. L., MURY, W. V., PINTO, N. O., BRUNINI, T. M. Major depression induces oxidative stress and platelet hyperaggregability. **Journal of Psychiatric Research**, v. 61, p. 19-24, 2015.
- OSTADHADI, S., AHANGARI, M., NIKOUI, V., NOROUZI-JAVIDAN, A., ZOLFAGHARI, S., JAZAERI, F., DEHPUR, A. R. Pharmacological evidence for the involvement of the NMDA receptor and nitric oxide pathway in the antidepressant-like effect of lamotrigine in the mouse forced swimming test. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 82, p. 713-721, 2016.
- PALTA, P., SAMUEL, L. J., MILLER III, E. R., SZANTON, S. L. Depression and oxidative stress: Results from a meta-analysis of observational studies. **Psychosomatic Medicine**, v. 76, n. 1, p. 12-19, 2014.

PANDEY, A. K., KUMAR, P., SINGH, P., TRIPATHI, N. N., BAJPAI, V. K. Essential Oils: Sources of Antimicrobials and Food Preservatives. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. January, p. 1–14, 2017.

PANDYA, C. D.; HOWELL, K. R.; PILLAI, A. Antioxidants as potential therapeutics for neuropsychiatric disorders. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 46, p. 214–223, 2013.

PERVANIDOU, P., MAKRIS, G., CHROUSOS, G., AGORASTOS, A. Early life stress and pediatric posttraumatic stress disorder. **Brain sciences**, v. 10, n. 3, p. 169, 2020.

PICÓN-PAGÈS, P.; GARCIA-BUENDIA, J.; MUÑOZ, F. J. Functions and dysfunctions of nitric oxide in brain. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease**, v. 1865, n. 8, p. 1949–1967, 2019.

PITSILLOU, E., BRESNEHAN, S. M., KAGARAKIS, E. A., WIJOYO, S. J., LIANG, J., HUNG, A., KARAGIANNIS, T. C. The cellular and molecular basis of major depressive disorder: towards a unified model for understanding clinical depression. **Molecular Biology Reports**, v. 47, n. 1, p. 753–770, 2020.

PLANCHEZ, B.; SURGET, A.; BELZUNG, C. Animal models of major depression: drawbacks and challenges. **Journal of Neural Transmission**, v. 126, n. 11, p. 1383–1408, 2019.

RAGLAN, G. B.; SCHMIDT, L. A.; SCHULKIN, J. The role of glucocorticoids and corticotropin-releasing hormone regulation on anxiety symptoms and response to treatment. **Endocrine Connections**, v. 6, n. 2, p. R1–R7, 2017.

RAI, A., GILL, M., KINRA, M., SHETTY, R., KRISHNADAS, N., RAO, C. M., KUMAR, N. Catechin ameliorates depressive symptoms in sprague dawley rats subjected to chronic unpredictable mild stress by decreasing oxidative stress. **Biomedical Reports**, v. 11, n. 2, p. 79–84, 2019.

RIDLEY, M., RAO, G., SCHILBACH, F., PATEL, V. Poverty, depression, and anxiety: Causal evidence and mechanisms. **Science**, v. 370, n. 6522, 2020.

RONCHETTI, S. A., PINO, M. T. L., CORDEIRO, G., BOLLANI, S. N., RICCI, A. G., DUVILANSKI, B. H., CABILLA, J. P. Soluble guanylyl cyclase $\alpha 1$ subunit is a key mediator of proliferation, survival, and migration in ECC-1 and HeLa cell lines. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–11, 2019.

ROY, K.; SAHA, A.; SENGUPTA, C. Exploring effects of different antioxidants on dexamethasone-induced lipid peroxidation using common laboratory markers. **Acta poloniae pharmaceutica**, v. 61, n. 1, p. 77–90, 2004.

SAAVEDRA, K., MOLINA-MÁRQUEZ, A. M., SAAVEDRA, N., ZAMBRANO, T., SALAZAR, L. A. Epigenetic modifications of major depressive disorder. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 8, p. 1–20, 2016.

SALIM, S. Oxidative stress and the central nervous system. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 360, n. 1, p. 201–205, 2017.

SARRIS, J., PANOSSIAN, A., SCHWEITZER, I., STOUGH, C., SCHOLEY, A. Herbal medicine for depression, anxiety and insomnia: A review of psychopharmacology and clinical evidence. **European Neuropsychopharmacology**, v. 21, n. 12, p. 841–860, 2011.

SASIDHARAN, S., CHEN, Y., SARAVANAN, D., SUNDRAM, K. M., LATHA, L. Y. Extraction, isolation and characterization of bioactive compounds from plants' extracts. **African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines**, v. 8, n. 1, p. 1–10, 2011.

SAVAGE, K., FIRTH, J., STOUGH, C., SARRIS, J. GABA-modulating phytomedicines for anxiety: A systematic review of preclinical and clinical evidence. **Phytotherapy Research**, v. 32, n. 1, p. 3-18, 2017.

SCHMID, C. L.; BOHN, L. M. Serotonin, but not N-methyltryptamines, activates the serotonin 2A receptor via a β -arrestin2/Src/Akt signaling complex in vivo. **Journal of Neuroscience**, v. 30, n. 40, p. 13513–13524, 2010.

SCHATZBERG, A. F.; DEBATTISTA, Charles. **Manual de psicofarmacologia clínica**. Porto Alegre: Artmed, 2017.

SESTAKOVA, N., PUZSEROVA, A., KLUKNAVSKY, M., BERNATOVA, I. Determination of motor activity and anxiety-related behaviour in rodents: methodological aspects and role of nitric oxide. **Interdisciplinary toxicology**, v. 6, n. 3, p. 126, 2013.

SCHUCH, J. J., ROEST, A. M., NOLEN, W. A., PENNINX, B. W., DE JONGE, P. Gender differences in major depressive disorder: Results from the Netherlands study of depression and anxiety. **Journal of Affective Disorders**, v. 156, p. 156–163, 2014.

SCHIELE, M. A.; GOTTSCHALK, M. G.; DOMSCHKE, K. The applied implications of epigenetics in anxiety, affective and stress-related disorders-A review and synthesis on psychosocial stress, psychotherapy and prevention. **Clinical psychology review**, v. 77, p. 101830, 2020.

SHAFIEE, M., AREKHI, S., OMRANZADEH, A., SAHEBKAR, A. Saffron in the treatment of depression, anxiety and other mental disorders: Current evidence and potential mechanisms of action. **Journal of Affective Disorders**, v. 227, n. August 2017, p. 330–337, 2018.

SHARP, B. M. Basolateral amygdala and stress-induced hyperexcitability affect motivated behaviors and addiction. **Translational psychiatry**, v. 7, n. 8, p. e1194-e1194, 2017.

SHICHIRI, M. The role of lipid peroxidation in neurological disorders. **Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition**, v. 54, n. 3, p. 151–160, 2014.

SKUPIO, U., TERTIL, M., SIKORA, M., GOLDA, S., WAWRZCZAK-BARGIELA, A., PRZEWLOCKI, R. Behavioral and molecular alterations in mice resulting from chronic treatment with dexamethasone: relevance to depression. **Neuroscience**, v. 286, p. 141-150, 2015.

SLATTERY, D. A; CRYAN, J. F. Using the rat forced swim test to assess antidepressant-like activity in rodents. **Nature Protocols**, v. 7, n. 6, p. 1009–1014, 2012.

SPIERS, J. G., CHEN, H. J. C., SERNIA, C., LAVIDIS, N. A. Activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal stress axis induces cellular oxidative stress. **Frontiers in neuroscience**, v. 8, p. 456, 2015.

STANBURY, R. M.; GRAHAM, E. M. Systemic corticosteroid therapy - Side effects and their management. **British Journal of Ophthalmology**, v. 82, n. 6, p. 704–708, 1998.

STEENKAMP, L. R., HOUGH, C. M., REUS, V. I., JAIN, F. A., EPEL, E. S., JAMES, S. J., LINDQVIST, D. Severity of anxiety– but not depression– is associated with oxidative stress

in Major Depressive Disorder. **Journal of Affective Disorders**, v. 219, n. December 2016, p. 193–200, 2017.

STERNER, E. Y.; KALYNCHUK, L. E. Behavioral and neurobiological consequences of prolonged glucocorticoid exposure in rats: Relevance to depression. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 34, n. 5, p. 777–790, 2010.

SWAMY, M. K.; AKHTAR, M. S.; SINNIAH, U. R. Antimicrobial properties of plant essential oils against human pathogens and their mode of action: An updated review. v. 2016, 2016.

SYLVERS, P.; LILIENFELD, S. O.; LAPRAIRIE, J. L. Differences between trait fear and trait anxiety: Implications for psychopathology. **Clinical Psychology Review**, v. 31, n. 1, p. 122–137, 2011.

TRIPATHI, S. J., CHAKRABORTY, S., SRIKUMAR, B. N., RAJU, T. R., RAO, B. S. Prevention of chronic immobilization stress-induced enhanced expression of glucocorticoid receptors in the prefrontal cortex by inactivation of basolateral amygdala. **Journal of Chemical Neuroanatomy**, v. 95, n. December 2017, p. 134–145, 2019.

THIBAUT, F. Corticosteroid-induced psychiatric disorders: genetic studies are needed. **European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience**. v. 269, p. 623–625. 2019.

THUONG, P. T., HUNG, T. M., KHOI, N. M., NHUNG, H. T. M., CHINH, N. T., QUY, N. T., NA, M. Cytotoxic and anti-tumor activities of lignans from the seeds of Vietnamese nutmeg *Myristica fragrans*. **Archives of pharmacal research**, v. 37, n. 3, p. 399–403, 2014.

VAN BODEGOM, M.; HOMBERG, J. R.; HENCKENS, M. J. A. G. Modulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis by early life stress exposure. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 11, n. April, p. 1–33, 2017.

VAVÁKOVÁ, M.; ŮURAČKOVÁ, Z.; TREBATICKÁ, J. Markers of Oxidative Stress and Neuroprogression in Depression Disorder. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2015, 2015.

VIOLI, F.; PIGNATELLI, P. Platelet NOX, a novel target for anti-thrombotic treatment. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 111, n. 5, p. 817–823, 2014.

WANG, W., ZHOU, T., JIA, R., ZHANG, H., ZHANG, Y., WANG, C., XUE, W. NMDA receptors and L-arginine/nitric oxide/cyclic guanosine monophosphate pathway contribute to the antidepressant-like effect of Yueju pill in mice. **Bioscience Reports**, v. 39, n. 9, p. BSR20190524, 2019.

WANG, M., WEI, J., YANG, X., NI, P., WANG, Y., ZHAO, L., MA, X. The level of IL-6 was associated with sleep disturbances in patients with major depressive disorder. **Neuropsychiatric disease and treatment**, v. 15, p. 1695, 2019.

WANG, Z. J., TABAKOFF, B., LEVINSON, S. R., HEINBOCKEL, T. Inhibition of Na v 1.7 channels by methyl eugenol as a mechanism underlying its antinociceptive and anesthetic actions. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 36, n. 7, p. 791–799, 2015.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **World health statistics 2016: monitoring health for the SDGs sustainable development goals**. World Health Organization, 2016.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Depression and other common mental disorders: global health estimates**. World Health Organization, 2017.

WRÓBEL, A., SEREFKO, A., WLAŻ, P., POLESZAK, E. 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**, v. 54, n. 2013, p. 243–248, 2014.

XU, Y., WANG, C., J KLABNIK, J., M O'DONNELL, J. Novel therapeutic targets in depression and anxiety: antioxidants as a candidate treatment. **Current neuropharmacology**, v. 12, n. 2, p. 108–19, 2014.

YANG, J., RUCHTI, E., PETIT, J. M., JOURDAIN, P., GRENNINGLOH, G., ALLAMAN, I., MAGISTRETTI, P. J. Lactate promotes plasticity gene expression by potentiating NMDA signaling in neurons. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 33, p. 12228-12233, 2014.

YOHN, C. N.; GERGUES, M. M.; SAMUELS, B. A. The role of 5-HT receptors in depression Tim Bliss. **Molecular Brain**, v. 10, n. 1, p. 1–12, 2017.

YUSTE, J. E., TARRAGON, E., CAMPUZANO, C. M., ROS-BERNAL, F. Implications of glial nitric oxide in neurodegenerative diseases. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 9, n. AUGUST, p. 1–13, 2015.

ZALACHORAS, I., HOLLIS, F., RAMOS-FERNÁNDEZ, E., TROVO, L., SONNAY, S., GEISER, E., MORATÓ, L. Therapeutic potential of glutathione-enhancers in stress-related psychopathologies. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 114, n. March, p. 134–155, 2020.

ŻMUDZKA, E., SAŁACIAK, K., SAPA, J., PYTKA, K. Serotonin receptors in depression and anxiety: Insights from animal studies. **Life Sciences**, v. 210, n. August, p. 106–124, 2018.

ZOU, W.; FENG, R.; YANG, Y. Changes in the serum levels of inflammatory cytokines in antidepressant drug-naïve patients with major depression. **PloS one**, v. 13, n. 6, 2018.

ANEXOS



Universidade
Federal da
Paraíba

Comissão de Ética no
Uso de Animais

Protocolo



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "ESTUDO DOS EFEITOS ANTIDEPRESSIVO E ANSIOLÍTICO NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL E EVENTUAIS MECANISMOS DE AÇÃO DE COMPOSTOS FENILPROPANÓIDES: UMA ABORDAGEM IN SILICO E IN VIVO.", protocolada sob o CEUA nº 2109260819 (em anexo), sob a responsabilidade de Reinaldo Nóbrega de Almeida - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal da Paraíba (CEUA/UFPB) na reunião de 11/10/2019.

We certify that the proposal "STUDY OF ANTIDEPRESSIVE AND ANSIOLITIC EFFECTS ON THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM AND EVENTUAL PHENYLPROPANOIC COMPOUNDS ACTION MECHANISMS: AN IN SILICO AND IN VIVO APPROACH.", utilizing 306 Heterogenics mice (306 males), protocol number CEUA 2109260819 (in annex), under the responsibility of Reinaldo Nóbrega de Almeida - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was approved by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Paraíba (CEUA/UFPB) in the meeting of 10/11/2019.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: de **09/2019 a 07/2021**

Área: **Fisiologia E Patologia**

Origem: **Unidade de Produção Animal IPeFarm**

Espécie: **Camundongos heterogênicos**

sexo: **Machos**

Idade: **90 a 90 dias**

N: **306**

Linhagem: **Mus musculus - Swiss**

Peso: **25 a 30 g**

Local do experimento: O laboratório de psicofarmacologia localizada na Universidade Federal da Paraíba dispõe de infra-estrutura adequada e capaz de possibilitar a realização de todos os métodos especificados no presente projeto, bem como a realização de outras técnicas comportamentais e bioquímicas que possam ser superadas ao longo de sua execução.

João Pessoa, 16 de outubro de 2019

Isolania Gisela A. Gonçalves

Prof. Dra. Isolania Gisela Albuquerque Gonçalves
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal da Paraíba

Ricardo Remão Guerra

Prof. Dr. Ricardo Remão Guerra
Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal da Paraíba

PRODUÇÃO CIENTÍFICA DURANTE O DOUTORADO

CAPÍTULOS DE LIVROS PUBLICADOS

SALVADORI, M. G. S. S.; **CALIXTO, P. S.**; GUEDES, E. C.; SILVA, D. P.; ALVES, C. C.; SANTOS, A. M. F.; ARAUJO, A. N. V.; CAVALCANTE, I. L.. COMPREENDENDO O TRANSTORNO DE ANSIEDADE GENERALIZADA. In: Suellen Marinho de Andrade. (Org.). Neurociência Teoria e Prática Clínica. 1ed. Pará de Minas: Virtual Books, 2017, v. 1, p. 1-195.

SALVADORI, M. G. S. S.; GUEDES, E. C.; **DA SILVA CALIXTO, POLIANE**; SILVA, D. P.; ALVES, C. C.; SANTOS, A. M. F.; ARAUJO, A. N. V.; CAVALCANTE, I. L. . NEUROBIOLOGIA E TRATAMENTO DA FIBROMIALGIA. In: Suellen Marinho de Andrade. (Org.). Neurociência e Reabilitação. 1ed. Pará de Minas: Virtual Books, 2017, v. 1, p. 1-207.

APRESENTAÇÃO DE TRABALHOS:

Patrik Saul Zarpellon Barbosa, Aline Matilde Ferreira dos Santos, César Carneiro Alves, Vinicius Ribeiro, Érika Cruz Guedes, Tayla Hermínio Moraes, Kaíque Gervazio, **Poliane Calixto**, Ikla Cavalcante, Alana Araújo, Mirian Stiebbe Salvadori. PADRONIZAÇÃO DE UM MODELO DE ESTRESSE SUBCRÔNICO IMPREVISÍVEL PARA INDUÇÃO DO COMPORTAMENTO TIPO DEPRESSIVO. 2018.

CALIXTO, P. S. ESTUDO DO EFEITOS ANSIOLÍTICOS E ANTIDEPRESSIVOS DO SESQUITERPENO ALFABULNESENO NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL E SEUS POSSÍVEIS MECANISMOS DE AÇÃO. 2017.

PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS

I Curso de farmacologia Básica -Prof. Dr. Allan Alencar. 2020. (Outra).

(Neuro)Ciência para educação: Uma janela de oportunidades para o Brasil. 2018. (Outra).

Simpósio Paraibano de Biossegurança e Controle de Infecção Hospitalar e do minicurso “Imunização e Risco Ocupacional”. 2018. (Simpósio).

8º Cursos e Conferências em Neurociências e Comportamento. 2017. (Outra).

V Fórum do Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos. 2017. (Outra).

ARTIGO PUBLICADO:

Send Orders for Reprints to reprints@benthamscience.net

Current Drug Targets, 2020, 21, 1-16

1

RESEARCH ARTICLE

In Silico Study Examining New Phenylpropanoids Targets with Antidepressant ActivityPoliane da Silva Calixto^a, Reinaldo Nóbrega de Almeida^b, Mirian G.S. Stiebbe Salvadori^c, Mayara dos Santos Maia^d, José Maria Barbosa Filho^e, Marcus Tullius Scotti^d and Luciana Scotti^{*,d}

Poliane da Silva Calixto^a, Reinaldo Nóbrega de Almeida^b, Mirian G. S. Stiebbe Salvadori^c, Mayara dos Santos Maia^d, José Maria Barbosa Filho^e, Marcus Tullius Scotti^d, Luciana Scotti^{*,d} ^aPsychopharmacology Laboratory, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Brazil; ^bDepartment of Physiology and Pathology, Laboratory of Psychopharmacology, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Brazil; ^cDepartment of Psychology, Laboratory of Psychopharmacology, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Brazil; ^dLaboratory of Chemoinformatics, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Brazil; ^eDepartment of Pharmaceutical Sciences, Pharmaceutical Technology Laboratory, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Brazil

Abstract: Background: Natural products, such as phenylpropanoids, which are found in essential oils derived from aromatic plants, have been explored during non-clinical psychopharmacology studies, to discover new molecules with relevant pharmacological activities in the central nervous system, especially antidepressant and anxiolytic activities. Major depressive disorder is a highly debilitating psychiatric disorder and is considered to be a disabling public health problem, worldwide, as a primary factor associated with suicide. Current clinically administered antidepressants have late-onset therapeutic actions, are associated with several side effects, and clinical studies have reported that some patients do not respond well to treatment or reach complete remission.

Objective: To review important new targets for antidepressant activity and to select phenylpropanoids with antidepressant activity, using Molegro Virtual Docker and Ossis Data Warris, and to verify substances with more promising antidepressant activity.

Results and Conclusion: An in silico molecular modeling study, based on homology, was conducted to determine the three-dimensional structure of the 5-hydroxytryptamine 2A receptor (5-HT_{2A}), then molecular docking studies were performed and the predisposition for cytotoxicity risk among identified molecules was examined. A model for 5-HT_{2A} homology, with satisfactory results, was obtained indicating the good stereochemical quality of the model. The phenylpropanoid 4-allyl-2,6-dimethoxyphenol showed the lowest binding energy for 5-HT_{2A}, with results relevant to the L-arginine/nitric oxide (NO)/cGMP pathway, and showed no toxicity within the parameters of mutagenicity, carcinogenicity, reproductive system toxicity, and skin-tissue irritability, when evaluated in silico; therefore, this molecule can be considered promising for the investigation of antidepressant activity.

Keywords: 4-allyl-2,6-dimethoxyphenol, chemoinformatics, antidepressive, toxicity, target, docking.

1. INTRODUCTION

Natural products from medicinal plants have been examined in non-clinical studies, both *in silico* and *in vivo*, in the psychopharmacology field, to discover new psychoactive drugs that act on the central nervous system (CNS) [1].

Aromatic medicinal plants contain bioactive metabolic compounds with pharmacological effects for the treatment of various diseases, including neurobehavioral disorders, such as depression, and generally demonstrate considerably reduced side effects compared with reference drugs [2]. Essential oils are among the most studied bioactive metabolites

and have been extremely important during the discovery of new molecules with relevant pharmacological activities, including antibacterial, antifungal, antiviral, anti-inflammatory, antitumor, antioxidant, anxiolytic, and antidepressant activities, in animal models [3, 4].

Essential oils contain various bioactive components, some in high concentrations, such as terpenes and phenylpropanoids, which have been reported to possess antidepressant activities [5-7]. One phenylpropanoid with potential antidepressant activity is 4-allyl-2,6-dimethoxyphenol, also known as methoxyeugenol, which is a substance belonging to the phenol class, in which phenol groups are replaced by an allyl group in position 4 and methoxy groups in positions 2 and 6 [8]. 4-allyl-2,6-dimethoxyphenol can be found in the root oils of *Sassafras albidum*, *Myristica fragrans*, and *Cinnamo-*

* Address correspondence to this author at the chemoinformatic Laboratory, Federal University of Paraíba, Paraíba, Brazil; E-mail: luciana.scotti@gmail.com.