



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUTOS NATURAIS E SINTÉTICOS**  
**BIOATIVOS (PPgPNSB)**

**PABLO RAYFF DA SILVA**

**INVESTIGAÇÃO DO EFEITO ANSÍOLÍTICO-SÍMILE E ANTIDEPRESSIVO-SÍ-  
MILE DO MONOTERPENO TETRAHIDROLINALOL POR MEIO DE  
ABORDAGENS *in silico* e *in vivo***

**JOÃO PESSOA**

**2023**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUTOS NATURAIS E SINTÉTICOS**  
**BIOATIVOS (PPgPNSB)**

**PABLO RAYFF DA SILVA**

**INVESTIGAÇÃO DO EFEITO ANSÍOLÍTICO-SÍMILE E ANTIDEPRESSIVO-SÍ-**  
**MILE DO MONOTERPENO TETRAHIDROLINALOL POR MEIO DE**  
**ABORDAGENS *in silico e in vivo***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Produtos Naturais, Sintéticos e Bioativos.

**Área de concentração:** Farmacologia

**Orientador:** Prof. Dr. Cícero Francisco Bezerra Felipe.

**Coorientador:** Prof. Dr. Reinaldo Nóbrega de Almeida.

**JOÃO PESSOA**

**2023**

**Catálogo na publicação**  
**Seção de Catalogação e Classificação**

S586i Silva, Pablo Rayff da.

Investigação do efeito ansiolítico-símile e antidepressivo-símile do monoterpene tetrahidrolinalol por meio de abordagens in silico e in vivo / Pablo Rayff da Silva. - João Pessoa, 2023.  
123 f. : il.

Orientação: Cícero Francisco Bezerra Felipe.  
Coorientação: Reinaldo Nóbrega de Almeida.  
Tese (Doutorado) - UFPB/CCS.

1. Produtos naturais. 2. Tetrahidrolinalol. 3. Ansiedade. 4. Depressão. 5. Estudo de Docking. 6. Químioinformática. I. Felipe, Cícero Francisco Bezerra. II. Almeida, Reinaldo Nóbrega de. III. Título.

UFPB/BC

CDU 547.9(043)

**PABLO RAYFF DA SILVA**

**INVESTIGAÇÃO DO EFEITO ANSIOLÍTICO-SÍMILE E ANTIDEPRESSIVO-  
SÍMILE DO MONOTERPENO TETRAHIDROLINALOL POR MEIO DE  
ABORDAGENS *in silico e in vivo***

Tese aprovada pela banca examinadora em: 27 de Outubro de 2023.



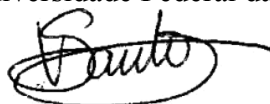
---

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



---

Prof. Dr. Reinaldo Nóbrega de Almeida  
Coorientador – Universidade Federal da Paraíba (UFPB)



---

Profa. Dra. Vanda Lucia dos Santos  
Examinadora Externa – Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)

---

Prof. Dra. Adriana Maria Fernandes de Oliveira Golzio  
Examinador Externa – Universidade Federal da Paraíba (UFPB)

---

Prof. Dr. Sócrates Golzio dos Santos  
Examinadora Interna – Universidade Federal da Paraíba (UFPB).

---

Prof. Dr. Ricardo Dias Castro  
Examinador Interno – Universidade Federal da Paraíba (UFPB).

## DEDICATÓRIA

A Deus por toda generosidade que me fez chegar até aqui e a minha família e amigos, por todo carinho, direcionamento e incentivo, *DEDICO*.

## AGRADECIMENTOS

A Deus e a Nossa Senhora minha gratidão pelo sustento e por todas as demonstrações de cuidado representado por tantas pessoas que passaram por mim durante essa trajetória. Essa conquista mais uma vez me faz ter a certeza que nunca estive sozinho!

Aos meus pais Sandra Maria Silva e Francisco Pereira da Silva Neto, irmãos: Flávia e Rodrigo, sobrinhos: Pedro, Manu e Mariana, cunhado: Alysson e cunhada: Nuêdja por acreditar e por ter sido sustento durante toda essa trajetória.

As minhas avós, Netinha e Severina (*in memoriam*) pelo grande exemplo de garra, sabedoria e simplicidade.

Aos meus afilhados Luiz Miguel e Luiz Felipe que apesar da pouca idade nos ensina diariamente a ter força e não desistir.

Aos meus orientadores Reinaldo Nóbrega de Almeida e Cícero Francisco Bezerra Felipe por serem exemplos de humanidade, competência e por me permitir internalizar grandes valores durante a minha passagem pela pós graduação.

Aos Professores Adriana Fernandes, Mírian Stiebbe Salvadori, Ricardo Castro, Luciana Scotti e Sócrates, por todos os aprendizados, parceria e amizade. Vocês são minhas grandes referências.

Ao Prof. Dr. Damião Pergentino por ter cedido a substância para execução desse projeto.

A minha querida orientadora Vanda Lucia dos Santos e aos demais professores que aceitaram compor a banca desse trabalho e por todas as contribuições de grande valia.

Aos meus alunos de Iniciação Científica: Hugo Fernandes, Arthur Lins e Anne Portela pela disponibilidade e contribuição nos experimentos. Vocês foram fundamentais, contem comigo sempre!

Aos meus amigos da Psicofarmacologia e do doutorado, Jéssica Cabral, Natália Pazos, Natália Ferreira, Mariana Dantas, Geovana Ferreira, Humberto Hugo, Álefe Monteiro, Poliana Calixto, Jaislânia, Carol, Elaine Araruna, Indyra e Ana Rita, por ter tido o privilégio de desfrutar da amizade de vocês. Lembrarei de cada um com muito carinho e gratidão.

A meu amigo Sr. Josué e Caroline Mangueira, pela amizade e parceria durante os quatro anos de doutorado. Pela solicitude e disposição de sempre me ajudar.

A instituição, UFPB e o Programa de Pós Graduação em Produtos Naturais, Sintéticos e Bioativos (PgPNSB) por ter me acolhido e possibilitado a concretização desse título.

Aos professores, que me instigaram durante toda a caminhada acadêmica durante minha graduação, mestrado e doutorado.

A Capes e CNPq pelo financiamento de todo esse trabalho.

A todos, o meu muito obrigado!

*"Combati o bom combate, terminei a minha carreira, guardei a fé (2 Tm, 4)"*

*Que darei eu ao Senhor, por todos os be-  
nefícios que me tem feito?*

*Salmos 116,12.*

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Informações sobre as proteínas selecionadas no estudo de docking: .....	58
<b>Tabela 2.</b> Peso relativo dos órgãos e peso final de camundongos fêmeas tratadas com o THL, na dose de 300 e 2000 $mg\ kg^{-1}$ via oral, após 14 dias.....	63
<b>Tabela 3.</b> Valores de RMSD para as proteínas selecionadas no estudo de docking.....	76
<b>Tabela 4.</b> Valores de energia de ligação analisados nas 14 proteínas selecionadas no estudo. Os melhores resultados podem estão destacados em negrito.....	77
<b>Tabela 5.</b> Inibição potencial <i>in silico</i> das isoformas do complexo citocromo P450 pelo composto THL.....	81
<b>Tabela 6.</b> Dados farmacocinéticos <i>in silico</i> estimados pelas plataformas SwissADME e pkCSM.....	82

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Esquemática da neurotransmissão monoaminérgica e sua influência em circuitos cerebrais.....	28
<b>Figura 2.</b> Esquemática da atividade da cetamina em circuitos cerebrais glutamatérgicos envolvidos na inibição de interneurônios gabaérgico e nos mecanismos transcricionais de fatores relacionados à neuroplasticidade..	32
<b>Figura 3.</b> Via da Guanilato Ciclase Solúvel/óxido nítrico sintase neuronal (GCS/nNOs) e suas alterações neurofisiológicas.....	34
<b>Figura 4.</b> Mecanismos neuroinflamatórios e oxidativos envolvidos na fisiopatologia de transtornos psicológicos – ansiedade e depressão..	36
<b>Figura 5.</b> Obtenção do tetrahidrolinalol a partir da reação de hidrogenação do linalol. ....	45
<b>Figura 6.</b> Desenho esquemático dos testes realizados para o estudo do potencial biológico do THL <i>in vivo</i> .....	51
<b>Figura 7.</b> Desenho esquemático do ensaio pré-clínico da estimativa da DL <sub>50</sub> oral segundo o protocolo da OECD..	52
<b>Figura 8.</b> Desenho esquemático dos estudos comportamentais.....	54
<b>Figura 9.</b> Protocolo experimental para investigação do envolvimento do receptor D <sub>1</sub> no efeito antidepressivo-símile do THL. ....	59
<b>Figura 10.</b> Protocolo experimental para investigação do envolvimento do receptor NMDA no efeito antidepressivo-símile do THL. ....	60
<b>Figura 11.</b> Protocolo experimental para investigação da via oxidonitrérgica (GCs/nNO) no efeito antidepressivo-símile do THL. ....	61
<b>Figura 12.</b> Procedimento experimental para obtenção de amostras de córtex pré-frontal e hipocampo para dosagem de nitrito.....	62
<b>Figura 13.</b> Cortes histológicos corados em HE nos órgãos (baço, coração, fígado, córtex, hipocampo, pulmão e rins) em animais tratados com o veículo (tween 80 0,5%) (A), THL (300 mg kg <sup>-1</sup> ) (B) e THL (2000 mg kg <sup>-1</sup> ) (C) submetidos à análise de toxicidade aguda. ....	65

<b>Figura 14.</b> Efeito do THC nas doses (37.5 – 600 mg kg <sup>-1</sup> v.o) e DZP (1 mg kg <sup>-1</sup> i.p), no número de entradas (A) e tempo de permanência (B) dos animais nos braços abertos do labirinto em cruz elevado.....	67
<b>Figura 15.</b> Efeito do THC nas doses (37.5 – 600 mg kg <sup>-1</sup> v.o) e DZP (2 mg kg <sup>-1</sup> i.p), no número de cruzamentos (A), número de grooming (B), e rearing (C) dos animais no campo aberto...	69
<b>Figura 16.</b> Efeito do THL nas doses (37,5 - 600 mg kg <sup>-1</sup> v.o) no tempo de permanência dos animais no <i>rota-rod</i> ..	71
<b>Figura 17.</b> Efeito do THL em diferentes doses (37,5 - 600 mg kg <sup>-1</sup> v.o) e Imipramina (IP) (30 mg kg <sup>-1</sup> i.p), no tempo de imobilidade (s) no teste de natação forçada..	72
<b>Figura 18.</b> Alinhamento da sequência do alvo transportador de noradrenalina do <i>Homo sapiens</i> (1) e do molde (Dopamina 1 de <i>Drosophila melanogaster</i> ) (2).....	74
<b>Figura 19.</b> Alinhamento da sequência do alvo receptor $\alpha_{2B}$ do <i>H. sapiens</i> (1) e do molde (receptor $\alpha_{2B}$ de <i>Bous taurus</i> ) (2).....	74
<b>Figura 20.</b> Gráfico de Ramachandran do modelo de homologia gerado para transportador de noradrenalina (A) e receptor $\alpha_{2B}$ (B). .....	75
<b>Figura 21.</b> Interações 2D e 3D entre o THL, a cetamina e a proteína NMDA.....	78
<b>Figura 22.</b> Interações 2D e 3D entre o THL, a Cloridrato SHC e a proteína D <sub>1</sub> .....	79
<b>Figura 23.</b> Perfil de absorção do composto tetrahidrolinalol (THL) pelo modelo <i>in silico</i> (Boiled-egg) via <i>SwissADME</i> .....	81
<b>Figura 24.</b> Tempo de imobilidade no modelo do Nado Forçado na avaliação do efeito antidepressivo-símile do tetrahidrolinalol (THL) por meio de receptores D <sub>1</sub> .....	83
<b>Figura 25.</b> Tempo de imobilidade no modelo do nado forçado na avaliação do efeito antidepressivo-símile do tetrahidrolinalol (THL) pela via glutamatérgica. ....	85
<b>Figura 26.</b> Tempo de imobilidade no modelo do Nado Forçado na avaliação do efeito antidepressivo-símile do tetrahidrolinalol (THL) pela via oxidonitrérgica.....	86
<b>Figura 27.</b> Concentração de nitrito (nM/g de peso da amostra) em grupos que receberam doses ativas de tetrahidrolinalol e azul de metileno. ....	87

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**5-HT:** Serotonina

**5-HT<sub>1A</sub>:** Receptor de Serotonina do Tipo 1A

**5-HT<sub>2A</sub>:** Receptor de Serotonina do Tipo 2A

**ADME:** Absorção, Distribuição, Metabolização e Excreção

**ADT:** Antidepressivos Tricíclicos

**AGI:** Absorção Gastrointestinal

**ANOVA:** Análise de Variância

**BDH:** (2E,6E)-2,6-bis(2,3-dimethoxyphenyl)hepta-2,6-diene-1-ol

**BDNF:** Fator Neutrófico Derivado do Encéfalo

**BDZs:** Benzodiazepínicos

**BHE:** Barreira Hematoencefálica

**BUP:** Bupropiona

**CA:** Campo Aberto

**Ca<sup>2+</sup>:** Íon de Cálcio

**cAMP:** Monofosfato de Adenosina Cíclico

**cGMP:** Guanosina 3,5-monofosfato Cíclico

**Cl:** Cloreto

**CONCEA:** Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

**CREB:** Proteína de ligação ao elemento de resposta cAMP

**D<sub>1</sub>:** Receptor de Dopamina do tipo 1

**D<sub>1</sub>-Like:** Receptor do tipo D1

**D<sub>2</sub>-Like:** Receptor do tipo D2

**DA:** Dopamina

**DL<sub>50</sub>:** Dose Letal Mediana

**DMAPP:** Dimetilalil-Pirofosfato

**DNA:** Ácido Desoxirribonucleico

**DSM:** Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais

**DZP:** Diazepam

**eNOS:** Óxido Nítrico Sintase Endotelial

**EPM:** Erro Padrão da Média

**EROs:** Espécies Reativas de Oxigênio

**FoxO:** *Forkhead box O protein*

**GABA<sub>A</sub>:** Receptor De Ácido Gama-Aminobutírico Tipo A

**GCs:** Guanilato Ciclase Solúvel

**GDNF:** Fator Neurotrófico Derivado da Glia

**Gi:** Proteína G inibitória

**Go:** Proteína G olfatória

**gP:** Substrato de Proteína G

**Gs:** Proteína G estimulatória

**GSH:** Glutathiona

**GSK-3 $\beta$ :** Glicogênio Sintase Cinase 3beta

**GTP:** Guanosina 5-trifosfato

**GWAS:** *Genome Wide Association Studies*

**HMG-CoA:** 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA

**HMOX1:** Gene da Heme Oxigenase 1

**HPA:** Hipotálamo, Hipófise e Adrenal

**i.p:** Intraperitoneal

**IL-10:** Interleucina 10

**IL-1 $\beta$ :** Interleucina 1beta

**IL-6:** Interleucina 6

**iMAO:** Inibidor da Monoaminaoxidase

**iNOS:** Óxido Nítrico Sintase Induzível

**IPP:** Isopentenil-Pirofosfato

**IRN:** Inibidor da Recaptação de Noradrenalina

**IRND:** Inibidor de Noradrenalina e Dopamina

**IRSN:** Inibidor da Recaptação De Serotonina-Noradrenalina

**ISRS:** Inibidor Seletivo da Recaptação De Serotonina

**KEAP1:** Proteína 1 Associada a ECH do Tipo Kelch

**LC:** *Locus Ceruleus*

**LCE:** Labirinto em Cruz Elevado

**LEO:** Óleo Essencial de Lavanda

**LPS:** Lipopolissacarídeo

**MAPK:** Proteína Cinase Ativada por Mitógeno

**MDA:** Malonaldeído

**MDR1:** Proteína de Resistência a Múltiplas Drogas

**MEP:** Fosfato Metileritritol

**mRNA:** Ácido Ribonucleico mensageiro

**mTOR:** Proteína Alvo Da Rapamicina Em Mamíferos

**MVD:** *Molegro Virtual Docker*

**NA:** Noradrenalina

**NEBA:** Número de Entradas nos Braços Abertos

**NET:** Transportador de Noradrenalina

**NFE2L2:** Fator 2 Relacionado ao Fator Nuclear Eritróide 2

**NFκB:** Fator de Transcrição Nuclear Kappa B

**NMDA:** N-metil-D-aspartato

**NMR:** Núcleo da Rafe

**nNOS:** Óxido Nítrico Sintase Neuronal

**NO:** Óxido Nítrico

**NOS:** Óxido Nítrico Sintase

**NT:** Neurotransmissor

**O<sub>2</sub><sup>-</sup>:** Ânion Superóxido

**OE:** Óleo Essencial

**OECD:** *Organization for Economic Cooperation and Development*

**OMS:** Organização Mundial da Saúde

**ONOO<sup>-</sup>:** Ânion Peroxinitrito

**PDB:** *Protein Data Bank*

**PI3K:** Fosfatidilinositol 3-cinase

**PIP2:** Fosfatidilinositol 4,5-bifosfato

**PIP3:** Fosfatidilinositol Trifosfato

**PKA:** Proteína Cinase A

**RMSD:** Desvio Quadrático Médio

**RPM:** Rotações Por Minuto

**S.E.M.:** Erro Padrão da Média

**SERT:** Transportador de Serotonina

**SNC:** Sistema Nervoso Central

**SNP:** Sistema Nervoso Periférico

**SOD:** Superóxido Dismutase

**TAG:** Transtorno de Ansiedade Generalizada

**TCA:** Teste de Campo Aberto

**TCC:** Terapia Cognitivo-Comportamental

**TDAH:** Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade

**TDM:** Transtorno Depressivo Maior

**THL:** Tetrahidrolinalol

**TI:** Tempo de Imobilidade

**NF:** Nado Forçado

**TNFR1:** Receptor do Fator De Necrose Tumoral 1

**TNFR2:** Receptor do Fator De Necrose Tumoral 2

**TNF- $\alpha$ :** Fator de Necrose Tumoral alfa

**TPBA:** Tempo de Permanência nos Braços Abertos

**TPSA:** Área de Superfície Polar Topológica

**trkB:** Receptor de Tropomiosina Quinase B

**TRR:** Teste de Rota Rod

**v.o:** Via Oral

**VDss:** Volume de Distribuição no Estado Estacionário

**VMAT2:** Transportador Vesicular de Monoamina do tipo 2

## RESUMO

SILVA, Pablo Rayff. **Investigação do efeito ansiolítico-símile e antidepressivo-símile do monoterpeno tetrahidrolinalol por meio de abordagens *in silico* e *in vivo*.** p. 125. Tese (Doutorado em Produtos Naturais, Sintéticos e Bioativos) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa – 2023.

As abordagens terapêuticas farmacológicas para o tratamento da ansiedade e depressão são focadas na modulação de sistemas de neurotransmissão envolvidos em sua neurobiologia – podendo-se destacar as vias catecolaminérgica, glutamatérgica e oxidonitrérgica. Dentre os possíveis tratamentos disponíveis, as plantas aromáticas são importantes arsenais terapêuticos, cujos constituintes químicos, a exemplo dos monoterpenos, são agentes de estudo na busca de novos tratamentos para as desordens citadas. Sendo assim, o presente estudo buscou avaliar a toxicidade aguda, o potencial ansiolítico- e antidepressivo-símile do monoterpeno tetrahidrolinalol em modelos *in silico* e *in vivo*. Inicialmente, o tratamento oral com THL, nas doses de 300 e 2000  $mg\ kg^{-1}$  apresentou baixa toxicidade, e sua  $DL_{50}$  estimada encontra-se em valores compreendidos entre 2000 e 5000  $mg\ kg^{-1}$ . Em adição, foram realizados testes comportamentais em camundongos tratados com THL (37,5-600  $mg\ kg^{-1}$ , v.o.) e submetidos aos testes de labirinto em cruz elevado (LCE), campo aberto (CA), *rota rod* (RR) e nado forçado. (NF) Como resultado, o THL nas doses de 37,5 e 75  $mg\ kg^{-1}$  induziu um aumento significativo no número de entradas (respectivamente em 72,7 e 64,3%) e no tempo de permanência (respectivamente 80,3 e 76,8%) dos animais nos braços abertos do LCE. Doses maiores do composto (300 e 600  $mg.kg^{-1}$ ), no entanto, causaram uma redução do número de cruzamentos (respectivamente em 30,6 e 31,6%) dos animais no CA, mas não alteraram a coordenação motora dos mesmos no RR. No NF, o tratamento com o monoterpeno reduziu significativamente o tempo de imobilidade dos camundongos nas doses de 150, 300 e 600  $mg.kg^{-1}$ , em 69,3, 60,9 e 68,7%, respectivamente. No tocante aos testes de ancoragem molecular, o THL apresentou valores de energia satisfatórios, quando comparados aos ligantes co-cristalizados, para os seguintes alvos: nNOs, GCs, IL-6, 5-HT<sub>1A</sub>, NMDAr e D<sub>1</sub>. Esses resultados foram corroborados nos testes *in vivo*, onde foi possível evidenciar o antagonismo do efeito antidepressivo símile do monoterpeno pelo SCH, um antagonista D<sub>1</sub> enantioesletivo; além disso, o efeito antidepressivo-símile do THL foi potencializado pela cetamina, um antagonista do receptor NMDA e pelo azul de metileno, um inibidor da GCs/NOs. Esse último efeito foi acompanhado da redução dos níveis de nitrito em estrutura de córtex e hipocampo dos camundongos tratados. Por fim, a substância em questão apresentou boa absorção e alta biodisponibilidade *in silico*. Tomados em conjunto, os resultados indicam que o THL é um monoterpeno destituído de toxicidade, segundo os protocolos utilizados, apresenta boa biodisponibilidade oral e é dotado de efeito ansiolítico-símile em doses baixas e sedativo e antidepressivo-símile em doses altas, sendo esse último efeito dependente, pelo menos em parte, dos sistemas de neurotransmissão dopaminérgico, glutamatérgico e oxidonitrérgico.

**Palavras chaves:** Tetrahidrolinalol. Ansiedade. Depressão. Estudos de Docking. Quimioinformática.

## ABSTRACT

SILVA, Pablo Rayff. **Investigation of the anxiolytic-like and antidepressant-like effect of the monoterpene tetrahydrolinalool through *in silico* and *in vivo* approaches.** p. 125. Tese (Doutorado em Produtos Naturais, Sintéticos e Bioativos) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa – 2023.

Pharmacological therapeutic approaches to treat anxiety and depression focus on the modulation of neurotransmission systems involved in their neurobiology – catecholaminergic, glutamatergic, and oxidonitrergic pathways stand out. Among the available treatments, aromatic plants stand out as an important therapeutic resource, and their chemical constituents (e.g., monoterpenes) are being studied in the search for new treatments for anxiety and depression. Therefore, the aim of this study was to evaluate the acute toxicity as well as the anxiolytic-like and antidepressant-like potential of the monoterpene tetrahydrolinalool (THL) through *in silico* and *in vivo* models. Initially, oral treatment with THL at doses of 300 and 2000  $mg/kg^{-1}$  showed low toxicity with an estimated LD50 ranging from 2000 to 5000  $mg/kg^{-1}$ . In addition, behavioral tests were performed in mice treated with THL (37.5-600  $mg/kg^{-1}$ , p.o.) using the elevated plus maze (EPM), open field (OF), rotarod (RR), and forced swim (FS) tests. Consequently, THL at doses of 37.5 and 75  $mg/kg^{-1}$  induced a significant increase in the number of entries (72.7% and 64.3%, respectively) and time spent (80.3% and 76.8%, respectively) by the animals in the open arms of the elevated plus maze. However, higher doses of the compound 300 and 600  $mg/kg^{-1}$  reduced the number of crossings made by the animals in the OF 30.6 % and 31.6% %, respectively) but did not alter their motor coordination in the RR. In the FS test, treatment with the monoterpene significantly reduced the immobility time of mice at doses of 150, 300, and 600  $mg/kg^{-1}$  by 69.3%, 60.9%, and 68.7%, respectively. In molecular docking assays, THL showed satisfactory energy values compared to co-crystallized ligands for the following targets: nNOS, GCs, IL-6, 5-HT<sub>1A</sub>, NMDAr, and D<sub>1</sub>. These results were confirmed using *in vivo* tests, which demonstrated antagonism of the antidepressant-like effect of the monoterpene by SCH, an enantioselective D<sub>1</sub> antagonist. In addition, the antidepressant-like effect of THL was potentiated by ketamine, an NMDA receptor antagonist, and by methylene blue, a GCs/NO inhibitor. The latter effect was accompanied by a reduction in nitrite levels in the cortex and hippocampal structures of treated mice. Finally, the compound showed good absorption and high bioavailability *in silico*. Taken together, the results indicate that THL is a nontoxic monoterpene, according to the protocols used. It shows good oral bioavailability and possesses a sedative effect at high doses, as well as anxiolytic- and antidepressant-like effects that appear to depend, at least in part, on dopaminergic, glutamatergic, and oxidonitrergic neurotransmission systems.

**Keywords:** Tetrahydrolinalool. Anxiety. Depression. Docking studies. Chemoinformatics

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	22
<b>2</b>	<b>FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b> .....	24
<b>2.1</b>	<b>Transtornos de ansiedade e depressão</b> .....	24
<b>2.2</b>	<b>Epidemiologia e impacto socioeconômico e cultural</b> .....	26
<b>2.3</b>	<b>Mecanismos neurais da ansiedade e depressão</b> .....	27
2.3.1	Teoria monoaminérgica .....	28
2.3.2	Teoria glutamatérgica .....	31
2.3.3	Via da Guanilato Ciclase Solúvel/óxido nítrico sintase neuronal (GCS/nNOs).....	32
2.3.4	Via inflamatória - citocinas TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ e IL-6 e Estresse Oxidativo.....	34
2.3.5	Aspectos neuroanatômicos, genéticos e ambientais envolvidos na depressão .....	36
<b>2.4</b>	<b>Terapias farmacológicas e não-farmacológicas nos transtornos de ansiedade e depressão</b> .....	38
2.4.1	Plantas medicinais e óleos essenciais no tratamento de transtornos mentais .....	41
<b>2.4.1.1</b>	<b><i>Linalol e o tetrahidrolinalol</i></b> .....	43
<b>2.5</b>	<b>Pesquisa não-clínica e modelos animais no estudo de drogas com potencial ansiolítico e antidepressivo</b> .....	45
2.5.1	Modelos animais de ansiedade.....	46
2.5.2	Modelos animais de depressão.....	47
<b>3.</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	49
<b>3.1</b>	<b>Objetivo geral</b> .....	49
<b>3.2</b>	<b>Objetivos específicos</b> .....	49
<b>4.</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	50
<b>4.1</b>	<b>Local de pesquisa, aspectos éticos e animais</b> .....	50
4.1.1	Drogas, Fármacos e Reagentes .....	50
4.1.2	Delineamento da Pesquisa e Protocolos experimentais .....	51
<b>4.1.2.1</b>	<b><i>Estimativa da DL<sub>50</sub> e Screening farmacológico Comportamental</i></b> .....	52
<b>4.1.2.2</b>	<b><i>Estudos comportamentais – Design Experimental</i></b> .....	53
<b>4.1.2.3</b>	<b><i>Atividade ansiolítica</i></b> .....	54
4.1.2.3.1	<i>Modelo do labirinto em cruz elevado (LCE)</i> .....	54
4.1.2.3.2	<i>Teste do Campo Aberto</i> .....	55
4.1.2.3.3	<i>Teste do rota rod</i> .....	55

4.1.2.4	<b>Atividade antidepressiva</b> .....	56
4.1.2.4.1	<i>Modelo de Natação Forçada</i> .....	56
4.1.3	Ensaio <i>in silico</i> .....	56
4.1.3.1	<b>Alinhamento de sequências proteicas</b> .....	56
4.1.3.2	<b>Modelagem por homologia</b> .....	56
4.1.4	Docking molecular.....	57
4.1.4.1	<b>Molegro Virtual Docker (MVD) 6.0</b> .....	57
4.1.5	Predições farmacocinéticas .....	58
4.1.6	Investigação do mecanismo farmacológico <i>in vivo</i> .....	58
4.1.6.1	<b>Envolvimento do receptor dopaminérgico D<sub>1</sub></b> .....	59
4.1.6.2	<b>Envolvimento do receptor NMDA</b> .....	59
4.1.6.3	<b>Envolvimento da via oxidonitrérgica</b> .....	60
4.1.6.4	<b>Determinação da concentração de nitrito</b> .....	61
4.2	<b>Análise estatística</b> .....	62
5.	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	63
5.1	<b>Estimativa da DL<sub>50</sub> e <i>screening</i> farmacológico comportamental</b> .....	63
5.2	<b>Análise histológica da toxicidade aguda</b> .....	64
5.3	<b>Avaliação do potencial ansiolítico símile do THL</b> .....	66
5.3.1	Teste do Labirinto em Cruz Elevado (LCE) .....	66
5.3.2	Teste do Campo aberto .....	68
5.3.3	Rota Rod .....	70
5.3.2	Avaliação do potencial antidepressivo símile do THL .....	71
5.4	<b>Testes <i>in silico</i></b> .....	73
5.4.1	Alinhamento de sequências proteicas .....	73
5.4.2	Modelagem por homologia .....	75
5.4.3	Docking molecular.....	76
5.4.4	Predições farmacocinéticas .....	79
5.5	<b>Investigação de possíveis mecanismos farmacológicos do THL <i>in vivo</i></b> .....	82
5.5.1	Envolvimento do sistema dopaminérgico .....	82
5.5.2	Envolvimento do sistema glutamatérgico .....	84
5.5.3	Envolvimento do sistema oxidonitrérgico .....	85
6	<b>CONCLUSÃO</b> .....	89
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	90

<b>ANEXO A – Comitê de Ética em Uso de Animais (CEUA) nº6479250620.....</b>	<b>108</b>
<b>ANEXO B – Protocolo Triagem Comportamental .....</b>	<b>109</b>
<b>ANEXO C - Publicações Vigência do Doutorado 2020 – 2023. ....</b>	<b>110</b>

## 1 INTRODUÇÃO

De acordo com a Organização Mundial da Saúde, estima-se que ao longo da vida, 16 % e 29 % da população poderá ser diagnosticada, respectivamente, com transtornos depressivos e de ansiedade, podendo esses dois distúrbios estarem associados em 40 – 75% dos casos (LORD et al., 2020). Sendo assim, pacientes com quadros instalados concomitantemente são mais improdutivos, tornando essas doenças como uma das principais causas de incapacidade psicossocial. Isso ocorre em razão dos agravos dos episódios, períodos mais prolongados das crises, sintomatologias mais acentuadas, refratariedade e inefetividade ao tratamento padrão (Wu; Fang, 2014; Zhou *et al.*, 2017).

A princípio, é válido ressaltar que a terapia farmacológica dos transtornos de ansiedade engloba o uso de benzodiazepínicos, azapirona (buspirona), medicamentos antidepressivos, dentre outros. Por outro lado, para o tratamento dos transtornos depressivos, uma variedade de fármacos também é empregada, destacando-se os antidepressivos tricíclicos (ADT), inibidores da monoaminaoxidase (iMAO), inibidores seletivos da receptação de serotonina (ISRS), inibidores da receptação de serotonina-noradrenalina (IRSN) e antidepressivos atípicos. No entanto, esses fármacos, apesar de eficazes, apresentam limitações com relação ao uso, provocando efeitos adversos que comprometem a memória e a função motora, além de um maior tempo de início de ação e maior susceptibilidade de desenvolvimento de tolerância e dependência (Girish *et al.*, 2012; Gomes *et al.*, 2010).

Com isso, considerando as limitações da terapia convencional, as plantas aromáticas constituem um potencial arsenal farmacológico para doenças psicossomáticas, como a ansiedade e a depressão. Dentre os constituintes de interesse farmacêutico tem-se os óleos essenciais (OE), que são metabólitos secundários formados por misturas complexas de substâncias químicas de alta volatilidade e lipofilia, que possibilita a permeação na barreira hematoencefálica, modulando importantes vias de sinalização no sistema nervoso central (SNC) (Diniz *et al.*, 2019; Manayi *et al.*, 2016).

Parte da composição química dos OE compreende as substâncias terpênicas, formadas por unidades de cinco átomos de carbono, o isopreno. Os compostos terpênicos podem apresentar-se estruturalmente com duas (monoterpenos) ou três (sesquiterpenos) unidades de isopreno. Seus efeitos ansiolíticos, antidepressivos e neuroprotetores são amplamente descritos na literatura, destacando-se o potencial biológico do linalol (Bianchini *et al.*, 2017).

A literatura mostra que plantas que produzem OE ricos em linalol têm sido utilizadas na medicina tradicional por serem dotadas de efeitos sedativo, ansiolítico e antidepressivo. O linalol é um álcool terciário, classificado como um monoterpene, com ações importantes sobre o sistema nervoso central (Dos Santos *et al.*, 2018; Stashenko, 2008). Nesse contexto, estudos com os óleos essenciais das folhas de *Aniba rosaeodora* (pau-rosa), *Aniba parviflora* (macacaporanga) e *Aeollanthus suaveolens* (cattinga-de-mulata) apresentaram atividade antidepressiva significativa, possivelmente em razão da presença do linalol como composto majoritário dos OEs. Em adição, tal efeito parece ser destituído de comprometimento motor e cognitivo (DOS SANTOS *et al.*, 2018), importantes efeitos indesejados comumente observados com os fármacos atualmente disponíveis no mercado farmacêutico.

Com relação a atividade ansiolítica do linalol, é relatado na literatura que tal efeito parece envolver a neurotransmissão GABAérgica (Harada *et al.*, 2018) e catecolaminérgica. Isso pode ser observado em um estudo que utilizou o óleo essencial de folhas de *Cinnamomum osmophloeum*, rico em linalol, o qual promoveu uma redução da concentração de neurotransmissores como serotonina, dopamina e noradrenalina na fenda sináptica (Cheng; Sheen; Chang, 2015). Neste estudo, os resultados sugerem que ambos enantiômeros do linalol S (-) e S (+) possuem propriedades ansiolíticas sem efeitos motores nos modelos *in vivo*.

Tomadas em conjunto, essa coletânea de evidências fazem do linalol um agente farmacologicamente promissor na modulação das respostas frente aos transtornos de ansiedade e/ou depressivos, permitindo o direcionamento e a realização de estudos com seus metabólitos, a exemplo do tetrahidrolinalol (THL) (3,7-dimetiloctan-3-ol) — que constitui um monoterpene álcool cíclico, produzido durante o metabolismo do linalol, ou obtido sinteticamente através de uma reação de hidrogenação da ligação dupla endocíclica (Belsito *et al.*, 2010). Sua aplicabilidade destina-se a produtos cosméticos devido a sua fragrância agradável e suas ações farmacológicas são escassas na literatura. Diante disso, esta pesquisa teve como objetivo avaliar o potencial ansiolítico e antidepressivo-símile do tetrahidrolinalol, um derivado do linalol, a partir de modelos *in silico* e *in vivo*, elucidando seus possíveis mecanismos de ação.

## 2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 2.1 Transtornos de ansiedade e depressão

Diversos são os motivos pelos quais a incidência de transtornos como a ansiedade e a depressão está aumentando ao redor do mundo. Dentre esses motivos, podemos citar o ritmo de vida acelerado da sociedade moderna, que muitas vezes exige um alto rendimento em múltiplas responsabilidades pessoais e profissionais (Pérez-cano *et al.*, 2020). A pressão social e do mercado de trabalho que, atualmente, está cada vez mais competitivo, acaba gerando uma necessidade de cargas extremas de jornada de trabalho e, conseqüentemente, um estresse exacerbado que contribui para o aparecimento de transtornos mentais (Fiksdal *et al.*, 2019; Li *et al.*, 2019).

Ansiedade é confundida com o medo, mas a diferença está no fato de que o medo é uma resposta emocional a uma ameaça iminente real ou percebida, enquanto que a ansiedade é a antecipação de uma possível ameaça futura (Demyttenaere; Heirman, 2020). A ansiedade pode ser compreendida como uma emoção caracterizada por preocupação, apreensão e nervosismo frente a uma situação percebida como potencial ameaça ao organismo (Demartini; Patel; Fancher, 2019; Goodwin; Stein, 2021).

A ansiedade é uma emoção natural, adaptativa e fisiológica que protege o organismo contra situações de risco, mas que quando em excesso se torna patológica e configura um transtorno de ansiedade (Szuhany; Simon, 2022). O que difere o medo e a ansiedade adaptativos dos transtornos de ansiedade são, principalmente, variáveis como persistência e duração dos sintomas, durando semanas ou meses e não reduzindo após passada a situação aversiva que iniciou os sintomas (Zhang *et al.*, 2019; Mazza *et al.*, 2020; Pérez-Cano *et al.*, 2020).

O Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (DSM) é um guia amplamente utilizado por profissionais de saúde mental para diagnosticar distúrbios psiquiátricos. Na sua quinta edição (DSM-V), o manual desmembra os transtornos de ansiedade de acordo com suas características principais, diferindo entre si em relação ao tipo de situações que induzem o comportamento de aversão ou esquiva e na ideação associada, entretanto, pode haver uma forte comorbidade entre eles e muitas características semelhantes, principalmente em relação à sintomatologia e ao tratamento (Demartini; Patel; Fancher, 2019; Williamson; Jaffee; Jorge, 2021; Apa, 2022).

O Transtorno de Ansiedade Generalizada (TAG), por exemplo, possui como características essenciais a ansiedade e a preocupação excessiva acerca de diversos eventos ou atividades, em uma expectativa apreensiva. Normalmente, a intensidade, a frequência e a duração da ansiedade frente àquele evento é desproporcional à probabilidade real de impacto no organismo ou na vida social do indivíduo (Szuhany; Simon, 2022). O TAG é o principal transtorno de ansiedade e o que possui maior incidência no mundo (Pérez-Cano *et al.*, 2020; Goodwin; Stein, 2021).

No DSM-V, existem ainda diversas outras classificações como o transtorno de ansiedade social, ou fobia social, o mutismo seletivo, a agorafobia, o transtorno de pânico e a fobia específica (frente a determinadas situações ou objetos específicos) (Sahle *et al.*, 2019). Cada um destes transtornos apresenta características de critérios diagnósticos diferentes e pode apresentar terapias farmacológicas e não farmacológicas variadas (Li *et al.*, 2019; Beurel; Toups; Nemeroff, 2020; Williamson; Jaffee; Jorge, 2021), as quais serão abordadas no subtópico 2.4 deste capítulo (terapias farmacológicas e não-farmacológicas).

Já em relação aos quadros depressivos, o DSM-V define como sendo “um conjunto de transtornos com a presença de um humor triste, vazio ou irritável, acompanhado de alterações somáticas e cognitivas que afetam significativamente a capacidade de funcionamento do indivíduo” (Marwood *et al.*, 2018; Apa, 2022). Dentro dessa definição, também existem diversas subclassificações de transtornos que, assim como os de ansiedade, diferem quanto às suas características, à duração e à intensidade.

O manual traz, portanto, que os transtornos depressivos podem ser classificados em Transtorno Depressivo Maior, Transtorno Disruptivo da Desregulação do Humor, Transtorno Depressivo Persistente (Distímia), Transtorno Disfórico Pré-Menstrual, Transtorno Depressivo Induzido por Substância ou Medicamento, Transtorno Depressivo Devido à Outra Condições Médica, Transtorno Depressivo Não Especificado ou outros (Apa, 2022).

A depressão clínica, ou Transtorno Depressivo Maior, por sua vez, reúne os sintomas mais característicos da maioria dos pacientes e é uma condição de saúde mental caracterizada por um estado persistente de tristeza profunda, perda de interesse ou prazer em atividades, distúrbios no sono e apetite, fadiga, baixa autoestima e dificuldade de concentração (Otte *et al.*, 2016; Beurel; Toups; Nemeroff, 2020). Esta condição clínica multifatorial pode afetar a rotina, o rendimento e a qualidade de vida geral do indivíduo (Van Poelgeest *et al.*, 2021; Da Silva *et al.*, 2022).

A depressão também está associada a sintomas físicos, como dores intensas e problemas gastrointestinais, além de estar associada a um risco aumentado de outras condições de saúde, como doenças cardiovasculares e diabetes. (Marwood *et al.*, 2018; Edinoff *et al.*, 2021). Para o diagnóstico do TDM, alguns critérios que devem ser levados em consideração estão elencados no Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais, na sua quinta edição (Apa, 2022).

Os principais critérios são: a) pelo menos cinco sintomas dentre: humor deprimido, diminuição do interesse, perda ou ganho significativo de peso, insônia ou hipersonia, fadiga, agitação ou retardo psicomotor, dificuldade de concentração, sentimentos de inutilidade ou culpa excessiva e pensamentos frequentes de morte; b) os sintomas não podem ser melhor explicados por outra doença; c) devem causar prejuízo no funcionamento social ou ocupacional; e d) não devem estar associados a um momento de luto normal (Beurel; Toups; Nemeroff, 2020; Apa, 2022).

Comumente, indivíduos depressivos também desenvolvem quadros agudos ou crônicos de ansiedade e, por consequência, o impacto na sua qualidade de vida geral é muito alto (Khushboo; Sharma, 2017; Fasipe *et al.*, 2018; Marwood *et al.*, 2018; Fiksdal *et al.*, 2019; Sahle *et al.*, 2019). Nesse sentido, a sintomatologia é mista e o diagnóstico pode ou não estar associado. Algumas classes terapêuticas, que serão discutidas no subtópico 2.4. deste trabalho, são utilizadas para o tratamento de ambos os transtornos Choi; Kim; Jeon, 2020).

Pacientes que apresentam comorbidade de depressão e ansiedade, ou “depressão ansiosa” (do inglês “*anxious depression*”) são conhecidos por apresentar perfis neurobiológicos distintos em comparação com aqueles que não possuem a comorbidade dos dois transtornos. Mesmo com a escassez de pesquisas sobre esse tema, diversos estudos têm revelado diferenças significativas entre a depressão ansiosa e a depressão não ansiosa no que diz respeito à função do eixo HPA, descobertas em exames estruturais e funcionais do cérebro e marcadores de inflamação (Choi; Kim; Jeon, 2020; Demyttenaere; Heirman, 2020).

## **2.2 Epidemiologia e impacto socioeconômico e cultural**

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), uma a cada oito pessoas, ou aproximadamente 970 milhões de pessoas no mundo convivem com algum tipo de transtorno mental ou psiquiátrico. Os Transtornos de Ansiedade são cada vez mais comuns, como a prin-

principal causa de disfunção psicossocial e normalmente associados a outros transtornos psiquiátricos como a depressão (Willie *et al.*, 2016). De acordo com a OMS, em dados de 2020, o número de pessoas com ansiedade e depressão aumentou em 26 e 28%, respectivamente, em consequência do estado pandêmico mundial com a COVID-19 (Who, 2022). Em 2019, a quantidade de pessoas com algum transtorno de ansiedade era de 301 milhões, incluindo 58 milhões da população jovem (crianças e adolescentes). Este montante equivale a aproximadamente 4% da população mundial e a 10% da população brasileira (Who, 2020).

A depressão, por sua vez, é uma das doenças mentais mais comuns, afetando pessoas de todas as idades e origens. Estima-se que mais de 264 milhões de pessoas em todo o mundo tenham depressão, de acordo com a Organização Mundial da Saúde (Abdallah *et al.*, 2018; Who, 2021). A sua prevalência pode variar significativamente de uma região para outra. Por exemplo, estudos sugerem que as taxas de depressão podem ser mais altas em países de alta renda, onde fatores de estresse como estilo de vida agitado e pressões sociais podem desempenhar um papel importante. Entre os gêneros, o feminino possui maior incidência de TDM e isso pode ser atribuído a uma combinação de fatores biológicos, hormonais, sociais e culturais (Sahle *et al.*, 2019; Dudek *et al.*, 2021; Van Poelgeest *et al.*, 2021).

Mundialmente, os transtornos depressivos e ansiosos são a principal causa para perda de qualidade de vida provocada por doenças “não-fatais”, o que corresponde a 5,5% de todos os Anos Perdidos por Invalidez (do inglês: “*Years Lost with Disease, YLD*”), a qual é uma métrica que calcula a quantidade de tempo em que o indivíduo possui uma saúde geral inferior à considerada ideal pela OMS. No Brasil, a OMS estima que aproximadamente 1,6 milhão de pessoas convivem atualmente com alguma causa de invalidez por conta destes transtornos, o que soma 6,1% de todos os YLD do país (Who, 2019).

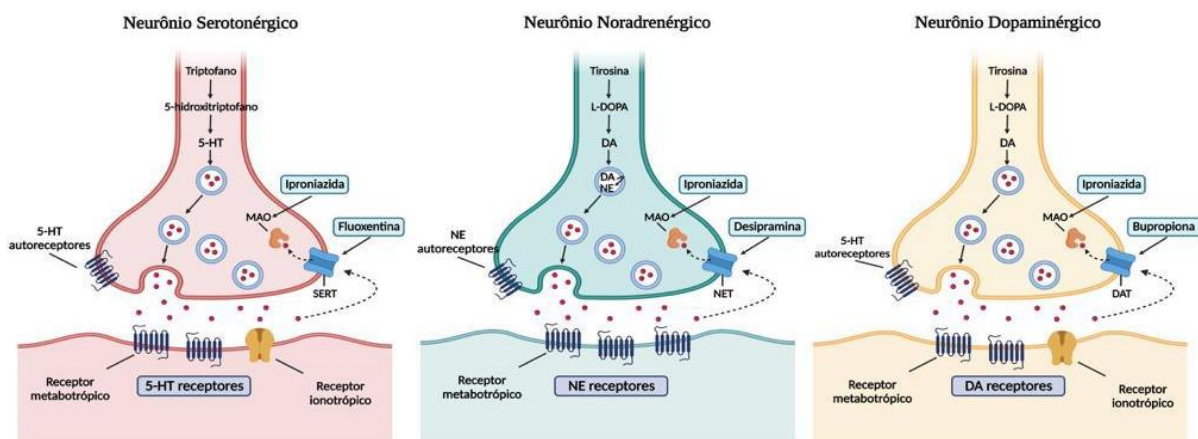
### **2.3 Mecanismos neurais da ansiedade e depressão**

Existem diversas teorias que buscam explicar os processos neurobiológicos envolvidos nos transtornos de ansiedade e depressão. Muitas destas vertentes conseguem explicar o surgimento e o agravamento sintomático tanto da ansiedade, como da depressão. A principal teoria, a monoaminérgica, explica os sintomas depressivos por meio de um desequilíbrio na concentração química de alguns neurotransmissores (NT) monoaminérgicos, como a serotonina (5-HT), a dopamina (DA) e a noradrenalina (NA) (Abdallah *et al.*, 2018). Além da teoria monoaminérgica, que será detalhada a seguir, existem diversas outras que apresentam boa fundamentação

científica e que, somadas, corroboram para uma maior compreensão dos transtornos. As principais abordam aspectos neurofisiológicos, genéticos e socioambientais (Dudek *et al.*, 2021).

### 2.3.1 Teoria monoaminérgica

A neurotransmissão monoaminérgica é fundamental para a sinalização do Sistema Nervoso Central (SNC) e do o Sistema Nervoso Periférico (SNP), uma vez que a serotonina (5-HT), a dopamina (DA) e a noradrenalina (NA) estão envolvidas na regulação de diversas funções do organismo, como atenção, sono, humor, dor, prazer e apetite (Homan *et al.*, 2015) (Figura 1). Essas moléculas são sintetizadas nos neurônios pré-sinápticos, a partir dos precursores L-triptofano para a 5-HT e tirosina para a DA e NA. Após sua síntese, tais moléculas são armazenadas em vesículas celulares, com o auxílio do Transportador Vesicular de Monoamina do tipo 2 (VMAT2), até sua eventual secreção na fenda sináptica, onde irão interagir com seus receptores pós-sinápticos (Hassanzadeh; Abbasi-Maleki; Mousavi, 2022).



**Figura 1.** Esquemática da neurotransmissão monoaminérgica e sua influência em circuitos cerebrais. Fonte: adaptado de Torres, Gainnetdinov e Caron, (2003); Pitsillou et al. (2020). Criado pelo Biorrender (2022).

Com relação à 5-HT, sua síntese ocorre no Núcleo da Rafe (NMR), localizado no mesencéfalo, sendo sua produção não restrita ao SNC, por isso sua desregulação envolve variados mecanismos, e está intimamente associada a doenças psiquiátricas, como depressão e ansiedade, isso se dá principalmente em razão da influência desse neurotransmissor em circuitos relacionados a emoções, memória e sono (Lesch *et al.*, 2012).

Sendo assim, as diversas funções da 5-HT por todo o organismo é refletida na quantidade de receptores para essa molécula, sendo classificados de 5-HT<sub>1</sub> a 5-HT<sub>7</sub>, apresentando ao todo 14 subtipos, dentre os quais vale destacar o 5-HT<sub>2A</sub> e o 5-HT<sub>1A</sub>, esse último compreende a uma das isoformas mais abundante no SNC, sendo encontrado em duas populações distintas, como auto-receptores somatodentríticos nos núcleos da rafe ou como heterorreceptores pós sinápticos em diversas áreas centrais inervadas por projeções serotoninérgicas, em neurônios piramidais e interneurônios Gabaérgicos (Pourhamzeh *et al.*, 2022)

Esses receptores são classificados como metabotrópicos acoplados às proteínas Gi/o, tendo como função a diminuição dos níveis intracelulares de Monofosfato de Adenosina cíclico (cAMP), o que gera uma ativação dos canais de potássio, aumentando assim o efluxo desse íon e promovendo uma inativação dos canais de cálcio dependente de voltagem, diminuindo a atividade neuronal (Gould, 1999).

Desse modo, como alvos farmacológicos da via serotoninérgica, tem-se como primeira linha para o tratamento da ansiedade e da depressão os Inibidores Seletivos da Recaptação de Serotonina (ISRS), que atuam na inibição do Transportador de Serotonina (SERT) no neurônio pré-sináptico, responsável por regular a concentração de 5-HT na fenda sináptica, por meio de um mecanismo de *feedback* negativo (Atigas, 2013; Nautiyal, 2017). Dessa maneira, a sua inibição ocasiona uma maior disponibilidade de 5-HT, elevando a sua ação nos neurônios pós-sinápticos, promovendo tanto a diminuição dos níveis de ansiedade e depressão, quanto o aumento na proliferação de células do hipocampo e expressão de proteínas relacionadas a neuroplasticidade, como Fator Neutrófico Derivado do Encéfalo (BDNF) (Baik, 2007).

A via dopaminérgica, através de mecanismos envolvendo o sistema mesolímbico apresenta íntima relação na modulação de comportamentos, como os da ansiedade e da depressão. Nos neurônios catecolaminérgicos, a tirosina-hidroxilase converte a tirosina no aminoácido L-Dopa, que em seguida, por meio de uma reação de descarboxilação, mediada pela enzima L-aminoácido aromático descarboxilase, será convertida em DA e armazenada em vesículas no neurônio pré-sináptico por meio da VMAT (Daubner; Le; Wang, 2010). A DA tem sua ação em receptores metabotrópicos acoplados à proteína G, sendo esses divididos em duas classes principais. Aqueles acoplados a proteína G<sub>s</sub>, que levam ao aumento dos níveis de cAMP, são os D<sub>1</sub>-Like, sendo representados pelos receptores D<sub>1</sub> e D<sub>5</sub>, já os que diminuem os níveis de cAMP, e consequentemente acoplados às proteínas Gi/o, participam da classe D<sub>2</sub>-Like, sendo eles os receptores D<sub>2</sub>, D<sub>3</sub> e D<sub>4</sub> (Baik, 2013; Gerson; Vishme, Grunhaus, 2007).

O receptor D<sub>1</sub>, ao ser ativado, pode mediar comportamentos relacionados à ansiedade, depressão, recompensa e a memória, além de deflagrar respostas imunológicas e neuroinflamatória. Seu mecanismo pode ser estimulatório ou inibitório, a depender da região ativada. Nas células da amígdala, há inibição dos interneurônios gabaérgicos intercalados nos agrupamentos paracapsulares, pela atuação em receptores D<sub>1</sub>, aumentando a angiogênese e o medo, já nas regiões basolateral, nos neurônios de projeção, o efeito é excitatório (Pinard *et al.*, 2008; Health *et al.*, 2015).

Com relação aos receptores D<sub>2</sub>, pré-sinápticos, encontram-se majoritariamente em terminais do córtex pré-sináptico pré-frontal. Sua ativação exerce efeito supressor gabaérgico em grupos de interneurônios parvalbumina positivos em células da amígdala. A administração local de agonistas do receptor D<sub>1</sub> ou D<sub>2</sub> na amígdala induz a efeitos semelhantes a ansiedade e depressão, e o contrário, efeitos ansiolíticos e antidepressivos (Hem *et al.*, 2015).

Já nos neurônios noradrenérgicos, a DA sintetizada a partir da tirosina é convertida em NA, por meio da ação da enzima dopamina  $\beta$ -monooxigenase. A NA tem sua ação difundida por todo o encéfalo, mas apresenta suas maiores concentração nos núcleos do tronco cerebral e no *Locus Ceruleus* (LC), regiões importantes para o processo cognitivo, comportamental e resposta de luta ou fuga (Waterhouse; Berridge, 2003).

A NA exerce suas atividades por meio de receptores adrenérgicos, que são classificados em  $\alpha$  e  $\beta$ . O papel excitatório da NA é mediado pelo receptor  $\alpha_1$ , acoplado às proteínas Gq/11, que levam ao aumento de cálcio intracelular, e por meio dos receptores  $\beta$ , esses acoplados à proteína Gs, que por meio da ativação da ciclase de adenilil leva ao aumento dos níveis de cAMP intracelular. Já a atividade inibitória está relacionada, majoritariamente, aos receptores  $\alpha_2$ , que acoplam às proteínas Gi/o, e conseqüentemente diminuem a concentração intracelular de cAMP (Triposkiadis *et al.*, 2009).

A maior expressão de autorreceptores, em especial do subtipo  $\alpha_2$ , foi maior observada em pacientes deprimidos no córtex pré-frontal e no LC, refletindo em uma diminuição da atividade noradrenérgica em receptores pós-sinápticos, visto a regulação negativa exercida pelos autorreceptores (Asnis; Sanderson; Praag, 1992). Enquanto que a análise de autorreceptores  $\alpha_1$  em pacientes com estado depressivo revelou que esse subtipo se encontra dessensibilizado, sendo esse um dos receptores responsáveis pelo aumento da liberação da NA na fenda sináptica (Holland; Robbins; Rowe, 2021).

Dessa forma, os Inibidores da Recaptação de Noradrenalina (IRNs) são cada vez mais usados na farmacoterapia da ansiedade e da depressão, tendo em vista o papel fundamental

exercido pela NA na regulação da emoção, tais fármacos vão inibir a atividade do Transportador de Noradrenalina (NET), dessa forma a NA deixa de ser transportada de volta para o neurônio pré-sináptico, aumentando assim o seu tempo de atuação em neurônios pós-sinápticos (Sehelton, 2019).

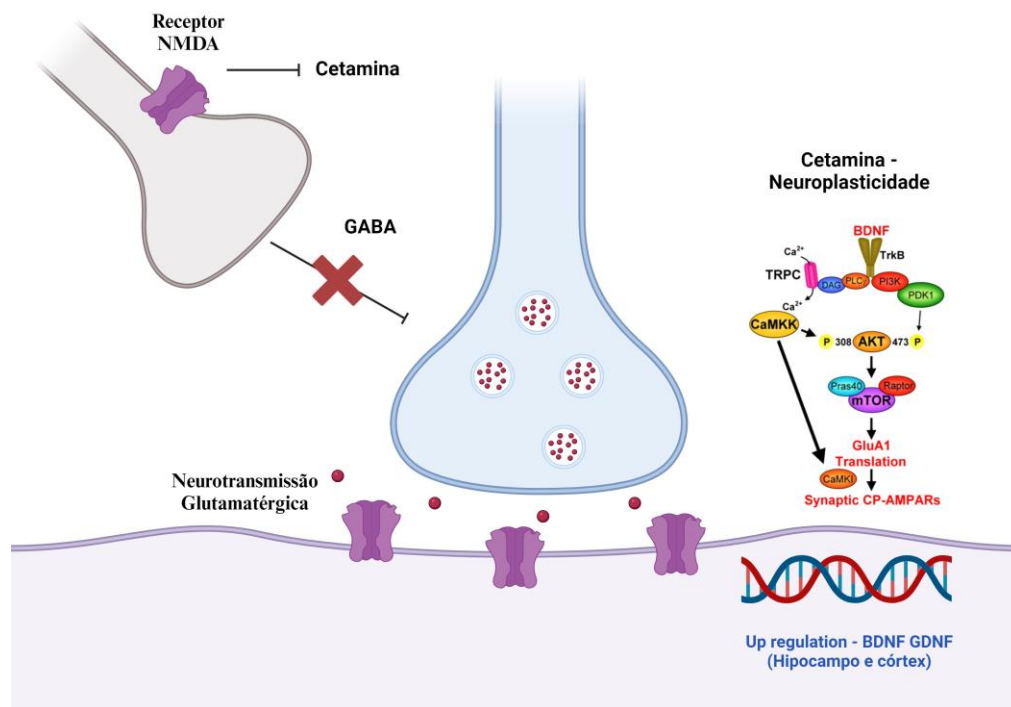
### 2.3.2 Teoria glutamatérgica

Apesar da consolidação de neurotransmissores catecolaminicos na neuroquímica da ansiedade e depressão, novas abordagens terapêuticas tornam-se potencialmente interessantes no desenvolvimento de tratamentos que atuem por diferentes circuitos neurais (Batista *et al.*, 2011). A modulação da via glutamatérgica é alvo de estudos na geração de ansiolíticos e antidepressivos. O glutamato é um neurotransmissor excitatório que atua em receptores ionotrópicos e metabotrópicos. O receptor N-metil-D-aspartato (NMDA) nome dado em razão do seu agonista seletivo, é um receptor iônico controlado por ligantes, condutor de corrente de cálcio, com alta densidade em regiões mesocorticolímbicas, mediando respostas fisiológicas relacionadas a função sináptica, plasticidade, aprendizagem, memória, depressão, ansiedade e medo (Niciu *et al.*, 2014).

Sua estrutura cristalográfica é composta por heterotetrâmeros de subunidades: GluN1 e GluN2A/B/C/D ou GluN3A/B. Os domínios carboxiterminal e aminoterminal das subunidades são regiões importantes na atividade regulatória do receptor (Lee *et al.*, 2014; Niciu *et al.*, 2014). Estudos pré-clínicos têm demonstrado que antagonistas como a cetamina e análogos (fenciclidina e dizocilpina) atuam diminuindo a atividade do canal, reduzindo o influxo de  $Ca^{2+}$  e as correntes mediadas pelo receptor NMDA. A cetamina atua na fisiopatologia de distúrbios psiquiátricos em doses subanestésicas, atingindo o tecido cerebral em concentrações micromolares (Zorumski; Izumi; Mennerick, 2016).

Em resumo, os agentes que atuam bloqueando o receptor NMDA, após a dissociação do glutamato em regiões como o hipocampo ventral e córtex pré-frontal afeta o comportamento emocional. Estudos com camundongos *knockout* demonstraram que a deleção das subunidades do receptor e a administração de drogas intra hipocampais melhoram as características fenotípicas da ansiedade e depressão (Batista *et al.*, 2008; Batista *et al.*, 2011) A neurobiologia dessas distúrbios apresenta mecanismos neurais ainda obscuros, no entanto, dados clínicos sugerem que as ações desses antagonistas podem estar relacionadas a restauração da plasticidade cerebral desadaptativas mediante a inibição dos receptores NMDA em interneurônios Gabaérgicos,

no córtex pré frontal medial, resultando na desinibição de neurônios piramidais glutamatérgicos e a deflagração de um pico glutamatérgico (Brum, 2001). Além disso, o bloqueio dos receptores NMDA, por antagonistas como a memantina, podem induzir a uma maior expressão do mRNA do BDNF e GDNF e do seu receptor *trkB* no córtex límbico de rato, melhorando as funções neurogênicas, que constitui uma das bases fisiopatológicas da ansiedade e depressão (Figura 2), (Niciu *et al.*, 2014).



**Figura 2.** Esquemática da atividade da cetamina em circuitos cerebrais glutamatérgicos envolvidos na inibição de interneurônios gabaérgico e nos mecanismos transcricionais de fatores relacionados à neuroplasticidade. Criado pelo Biorrender (2023).

### 2.3.3 Via da Guanilato Ciclase Solúvel/óxido nítrico sintase neuronal (GCS/nNOS)

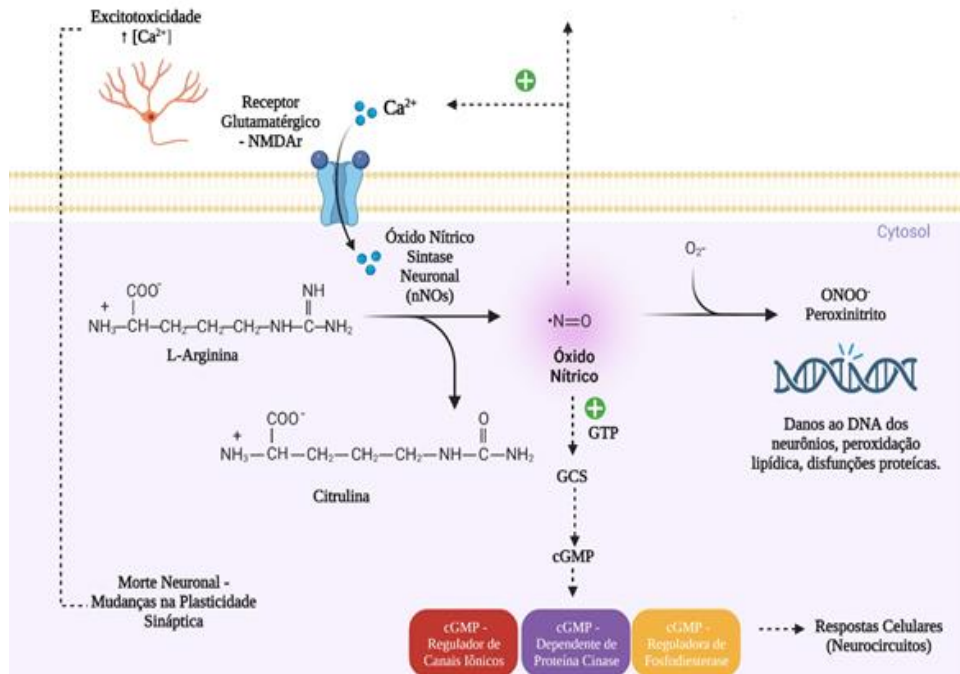
A ativação das enzimas GCS e nNOS têm sido considerada importante via molecular no agravamento do estado de humor em pacientes com transtornos comportamentais (MACCALLINI; AMOROSO, 2016). Níveis elevados de nNOS e GCS foram registrados no hipotálamo, hipocampo e córtex pré-frontal em modelos animais expostos ao estresse para indução do comportamento do tipo ansiedade e depressão (Gutiérrez *et al.*, 2020; Joca *et al.*, 2019; Calixto *et al.*, 2010).

Nos mamíferos existem três isoformas funcionais da enzima óxido nítrico sintase (NOS): nNOS (neuronal), eNOS (endotelial) e iNOS (induzível) (Alderton; Cooper; Knowles, 2001). A nNOS foi inicialmente descrita em neurônios, contudo pode ser encontrada na musculatura estriada esquelética, epitélio brônquico e traqueia (Kobzik *et al.*, 1993). A nNOS tem sua atividade regulada pelos níveis de cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) uma vez que só se liga à calmodulina na presença de altas concentrações citosólicas desse cátion bivalente. Quando estimulada, esta isoforma produz pouca quantidade de óxido nítrico (NO) a partir da L-arginina, o suficiente para que exerça suas funções fisiológicas (Alderton, Cooper; Knowles, 2001). Embora muito importante no sistema nervoso central, o NO, em níveis elevados, está relacionado no agravamento de quadros de ansiedade e depressão por estimular o aumento do estresse oxidativo e a inflamação no cérebro (Lee; Giuliani, 2019; Pitsikas, 2018; Yuste *et al.*, 2015; Salim; Chugh; Asghar, 2012).

O NO como mediador pró-inflamatório é um fator chave para o início de eventos que aumentam a atividade neuroinflamatória, principalmente por promover a dilatação e o aumento da permeabilidade da barreira hematoencefálica que favorecerá a migração de células inflamatórias periféricas para o tecido cerebral (COLEMAN, 2001). Células neuronais, em situações de estresse, geram NO e ânion superóxido ( $\text{O}_2^-$ ), que podem, então, se unir para formar o ânion peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ). O peroxinitrito é um poderoso oxidante capaz de iniciar a peroxidação lipídica da membrana plasmática, danificar diretamente o DNA, causar disfunção proteica e oxidar antioxidantes lipossolúveis (Lau; Tymianski, 2010; Hogg; Kalyanaraman, 1999; Radi *et al.*, 1991). Adicionalmente, o NO também pode ativar receptores de rianodina tipo 1, no retículo endoplasmático, e aumentar a concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico que resultará, entre outros efeitos, na geração de radicais livres e aumento da excitotoxicidade de glutamato e consequente excitotoxicidade mediada pela ativação excessiva dos receptores NMDA (Bal-Price; Brown, 2001). A hiperatividade dos receptores NMDA causará o influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  anormal nos neurônios pós-sinápticos e consequente superestimulação da nNOS e aumento da síntese de NO (Maccallini; Amoroso, 2016).

Por fim, foi relatado que o NO tem como principal alvo a GCS, enzima responsável pela conversão de guanosina 5-trifosfato (GTP) em guanosina 3,5-monofosfato cíclico (cGMP) (Denninger; Marletta, 1999). É conhecido que a via L-arginina-NO-cGMP, modulada pelas enzimas nNOS e GCS, é uma via de sinalização importante que se sugere estar implicada na regulação de uma variedade de processos comportamentais, cognitivos e emocionais, incluindo a ansiedade e depressão (Reiersen *et al.*, 2011; Picón-Pagès; Garcia-Buendia; Muñoz, 2019;

Calixto *et al.*, 2010; Kleppisch; Feil, 2009). Portanto, estudos indicam que a inibição da nNOS e GCS são valiosos alvos como estratégias eficazes para a terapia desses transtornos comportamentais (Singh; Walia, 2020; Maccallini; Amoroso, 2016; Yazir; Utkan; Aricioglu, 2012; Morretti *et al.*, 2011) (Figura 3).



**Figura 3.** Via da Guanilato Ciclastase Solúvel/óxido nítrico sintase neuronal (GCS/nNOS) e suas alterações neurofisiológicas. Criado pelo Biorrender (2023).

### 2.3.4 Via inflamatória - citocinas TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ e IL-6 e Estresse Oxidativo

Pesquisas tem demonstrado uma correlação direta entre os processos neuroinflamatórios e oxidativos pela submissão a condições de estresse, como fatores predisponentes para o desencadeamento de quadros de ansiedade e depressão (Dowlati *et al.*, 2010; Marc *et al.*, 2014). Isso acontece em razão dos altos níveis de expressão de EROs e malonaldeído (MDA), associadas a uma atividade reduzida do sistema antioxidante (SOD, GSH, NQA1), que nas regiões hipocâmpais demarcam dano oxidativo pelo enfraquecimento da capacidade de eliminar radicais livres. Ademais, esse desequilíbrio redox também influencia como mensageiros *upstream* ativando o NLRP3 e vias de sinalização inflamatória do NF $\kappa$ B culminando na produção de mediadores inflamatórios como como o nitrito e citocinas (Ji *et al.*, 2021).

Ressalta-se que, nas últimas décadas tem se demonstrado que existe uma correlação direta entre as disfunções imunológicas e o aumento dos níveis de mediadores inflamatórios,

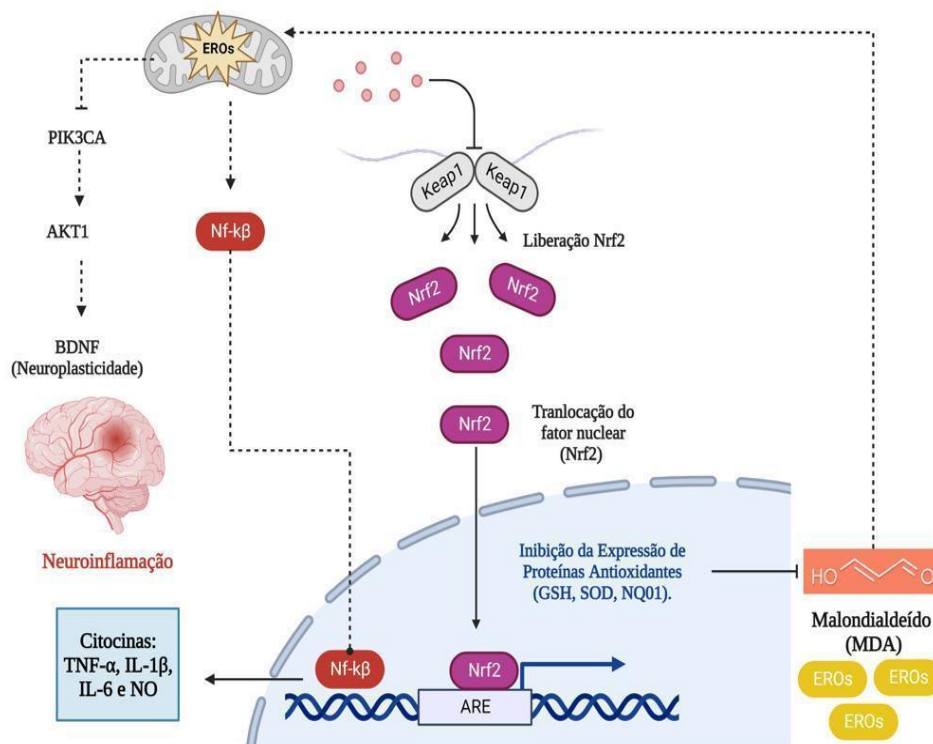
como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), interleucina 1beta (IL-1 $\beta$ ) e interleucina -6 (IL-6) em pacientes com transtornos de depressão e ansiedade. As citocinas são proteínas ou polipeptídios capazes de modular condições inflamatórias e imunológicas. Ao atingirem o SNC, participam na regulação neurofisiológica de circuitos que envolvem o metabolismo de neurotransmissores, hormônios e plasticidade neural (Vogelzangs *et al.*, 2016; Zou; Feng, Yang, 2018).

Os antidepressivos inibidores da recaptação de serotonina (ISRS) e os tricíclicos são capazes de causar uma depleção nos níveis de citocinas pró-inflamatórias e aumentar os níveis das citocinas anti-inflamatórias, a exemplo da IL-10. Postula-se que essa regulação se dá em razão do aumento da ativação dos receptores serotoninérgicos das células imunes, controlando a dinâmica de liberação de citocinas pró- e anti-inflamatórias. Um outro mecanismo parece envolver o aumento da produção do cAMP, que ativa a proteína cinase A (PKA) aumentando a produção da proteína de ligação ao elemento responsivo ao cAMP, denominado como CREB, diminuindo a produção de citocinas pró-inflamatórias (Kenis; Maes, 2002; Herr; Bode; Duerschmied, 2017).

O TNF- $\alpha$  é uma citocina pleiotrópica com papel importante na regulação de funções cognitivas e nos transtornos de ansiedade e depressão. Seu efeito biológico é exercido a partir da sua ligação aos receptores TNFR1 e TNFR2, expressos respectivamente em condições fisiológicas e induzidas, sinalizando diversos efeitos intracelulares. Esta citocina ativa o eixo hipotalâmico hipofisário adrenal (HPA), aumentando a atividade de transportadores neuronais de 5-HT e a estimulação da indoleamina 2,3-dioxigenase diminuindo a concentração de triptofano, impactando na fisiopatologia da ansiedade e depressão. Além disso, essa molécula está envolvida na ativação da micróglia cerebral, diminuindo marcadores da plasticidade sináptica e aumento de eventos neurodegenerativos (Postal; Appenzeller, 2011; Postal *et al.*, 2016; Krishnas; Cavanagh, 2012).

A via do NFE2L2 tem sido estudada como regulador importante nos quadros de ansiedade e depressão. Esse fator por sua vez ao ser ativado induz a expressão de genes citoprotetores e de desintoxicação. Isso acontece em razão que em estados de estresse oxidativo adequado, o NFE2L2 se desvincula do KEAP1, que é um inibidor natural do NFE2L2, e migra para o núcleo, onde se combina com o ARE, promovendo a transcrição gênica de antioxidantes como a SOD e HMOX (Hashimoto, 2018; Ji *et al.*, 2021). Outro mecanismo importante envolvido na inflamação presente nos quadros de depressão, envolve o desequilíbrio na via PIK3CA/AKT1, que

impacta diretamente na captação e transporte de neurotransmissores como serotonina, glutamato e acetilcolina, regulando assim os níveis e funções dos receptores de neurotransmissores. Além disso, essa via ao catalisar a conversão PIP2 em PIP3, induz a fosforilação de AKT1. Conseqüentemente, a forma fosforilada de AKT1 ativa várias vias *downstream*, incluindo as vias mTOR, FoxO, GSK-3 $\beta$  e NF $\kappa$ B, regulando a síntese proteica, proliferação celular, diferenciação, autofagia e apoptose e de fatores envolvidos na neuroplasticidade, como o BDNF (Figura 4) (Ji *et al.*, 2021).



**Figura 4.** Mecanismos neuroinflamatórios e oxidativos envolvidos na fisiopatologia de transtornos psicológicos – ansiedade e depressão. Criado pelo Biorrender (2023).

### 2.3.5 Aspectos neuroanatômicos, genéticos e ambientais envolvidos na depressão

Existe uma teoria que relaciona os sintomas depressivos à uma disfunção no circuito de recompensa e motivação. Esse sistema envolve áreas como o *nucleus accumbens* e está associado à sensação de prazer e motivação. Na depressão, existem evidências de que há disfunção nesse circuito, o que leva à perda de interesse e prazer em atividades antes gratificantes, um dos sintomas-chave da doença (Dudek *et al.*, 2021). Na literatura, também já existem achados de que o hipocampo, uma área do cérebro envolvida na regulação das emoções e na formação

de memórias, também desempenha um papel importante na depressão. A atrofia ou redução do volume do hipocampo tem sido observada em pessoas com depressão. A plasticidade neural, a capacidade do cérebro de se reorganizar e formar novas conexões, também pode ser afetada em pacientes com TDM (Micheli *et al.*, 2018).

Observações feitas ainda no século XIX, por psiquiatras europeus, como Morel, Griesinger, Musdley e Kraepelm, já relatavam a maior incidência de transtornos depressivos em algumas famílias europeias e, desde então, estudos clínicos buscando observar a existência de um componente genético na fisiopatologia da depressão vêm sendo realizados (Kuzminskaite *et al.*, 2021). A relação entre fatores genéticos e os transtornos de ansiedade e depressão, como a incidência de polimorfismos genéticos, interações gene-ambiente e predisposição poligênica (De Deurwaerdere; Di Giovanni, 2021) já é conhecida. Sabe-se que familiares de primeiro grau possuem um risco 2 vezes maior de desenvolver a doença quando comparado à população geral (Cai *et al.*, 2020).

Nos últimos 30 anos de pesquisa clínica genético-epidemiológica da depressão, trabalhou-se com a subclassificação de Leonhard que a divide em distúrbio bipolar, onde se enquadram a mania e depressão juntos, e o distúrbio depressivo unipolar, onde se encontram sintomas da depressão clínica (Wang; Wang; Chen, 2021). Nestes estudos, são observados dados importantes, como a incidência três vezes maior de depressão unipolar em um indivíduo que possui um parente de primeiro grau com depressão, enquanto que o risco de transtorno bipolar neste indivíduo é o mesmo que para a população geral. Em contrapartida, em um indivíduo com familiares com distúrbio bipolar o risco de ele desenvolver é de sete vezes maior (Penner-Foeke; Binder, 2019; Kuzminskaite *et al.*, 2021).

Em recentes Estudos de Associação Genômica Ampla (da sigla “GWAS” em inglês “*Genome Wide Association Studies*”), fica claro que o Transtorno Depressivo Maior é uma condição poligênica com a possível identificação de vários “*locus*”. Os principais identificados foram metilações do DNA, modificações em histonas (H3K14ac, HDAC2, H3K4ac, H3K4Me3 e H3K27me3) e diminuição de microRNA miR-1202 (Iga *et al.*, 2007; Hobara *et al.*, 2010; Fiori; Gross; Turecki, 2012). Apesar disso, a hereditariedade estimada (~40 %) é menor que para os outros transtornos neuropsiquiátricos, como a esquizofrenia, o transtorno bipolar e o Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade (TDAH), que possuem uma incidência hereditária de 75-80% (Penner-Foeke; Binder, 2019).

Isso sugere que, para a depressão, outros fatores contribuem significativamente mais para o surgimento do transtorno, como por exemplo características do ambiente social como

exposição ao estresse. Como exemplo, uma meta-análise foi realizada com 26 estudos e encontrou que traumas na infância, principalmente decorrentes de negligência ou abuso emocional estão fortemente relacionados com o aparecimento de depressão na idade adulta (KENDLER; Karkowski; Prescott, 1999; McGuffin, 2003; Mandelli; Petrelli; Serretti, 2015).

Ademais, alguns determinantes sociais como poder aquisitivo e o âmbito educacional aumentam significativamente o risco em desenvolver o transtorno. As características socioambientais nas quais os indivíduos estão inseridos cotidianamente pode impactar consideravelmente na incidência, na recidiva e no agravamento da sintomatologia dos quadros de ansiedade e depressão (MAO et al., 2021). Em locais em que há propensão a eventos estressantes e traumáticos podem contribuir e agravar o quadro da doença (Kuzminskaite *et al.*, 2021; Mckay *et al.*, 2021).

#### **2.4 Terapias farmacológicas e não-farmacológicas nos transtornos de ansiedade e depressão**

O tratamento destes transtornos geralmente envolve medidas farmacológicas e não-farmacológicas, somadas ao acompanhamento psicoterapêutico contínuo (Khushboo; Sharma, 2017; Fasipe *et al.*, 2018). Como medidas não-farmacológicas, já existem diversas evidências científicas da eficácia da realização de exercícios físicos e cardiovasculares regulares, bem como de mudanças na alimentação e na atividade laboral do indivíduo, meditação e/ou yoga (Li *et al.*, 2019; Kraus *et al.*, 2019; Demyttenaere; Heirman, 2020).

A psicoterapia representa uma importante ferramenta para o tratamento dos transtornos de ansiedade e a depressão (Rosa-Alcázar *et al.*, 2022; Schrammen *et al.*, 2022). Existem diversas abordagens psicoterápicas que possuem eficácia comprovada utilizadas cotidianamente pelos psicólogos, como a terapia cognitivo-comportamental (TCC), as terapias baseadas em *mindfulness* (Zemestani; Fazeli-Nikoo, 2020; Demyttenaere; Heirman, 2020) e as terapias de aceitação e compromisso. A TCC atualmente é a abordagem que possui maior quantidade de evidências científicas que comprovem sua eficácia no tratamento da ansiedade (Baker *et al.*, 2021) e também em outras condições clínicas como a depressão e transtorno obsessivo compulsivo (TOC) (Roper *et al.*, 2022).

Associado à psicoterapia, o tratamento farmacológico contribui para manter a estabilidade emocional do indivíduo, uma vez que essa modalidade de tratamento age sobre os sintomas característicos da ansiedade e da depressão, de forma crônica, e melhoram a qualidade de

vida do paciente (Thibaut, 2017; Harro, 2018). Além dos medicamentos convencionais, algumas terapias complementares vêm ganhando bastante destaque no campo científico, como a aromaterapia, que faz uso de óleos essenciais (OE), e a fitoterapia, que faz uso de chás e preparados de plantas dotadas de potenciais sedativo, ansiolítico e antidepressivo conhecidos (Turan-Kavradim; Yangöz; Ozer, 2021; Hartley; McLachlan, 2022).

O tratamento farmacológico deve ser iniciado quando não há resposta apenas com medidas não farmacológicas e acompanhamento psicoterapêutico. O psicólogo e o psiquiatra são fundamentais para o correto diagnóstico do momento ideal para início da terapia e decisão da posologia. O tratamento é sintomático, logo é imprescindível que o paciente continue com o acompanhamento psicológico (Moura *et al.*, 2020).

Muitos fármacos são utilizados tanto em quadros de ansiedade, como de depressão, ou em casos de comorbidade entre os dois transtornos (GIBSON-SMITH *et al.*, 2020). Os antidepressivos usados clinicamente auxiliam na redução dos sintomas depressivos, por meio de mecanismos que aumentam a concentração de monoaminas (serotonina, noradrenalina e/ou dopamina (Furukawa *et al.*, 2016) nas fendas sinápticas, com ações que vão desde o bloqueio da recaptação ou dos receptores monoaminérgicos a inibição da enzima monoamina oxidase (Khushboo; Sharma, 2017; Fasipe *et al.*, 2018).

Até a década de 1980, o tratamento farmacológico da depressão se limitava aos antidepressivos de primeira geração, dentre os quais se encontram os antidepressivos tricíclicos (ADTs), como a imipramina, desenvolvida em 1958, e os inibidores da monoamina oxidase (IMAO) (Furukawa *et al.*, 2016). Os Antidepressivos Tricíclicos (ADT), como a amitriptilina, nortriptilina e imipramina também inibem transportadores de monoaminas.

Os ADTs bloqueiam a recaptação de serotonina e noradrenalina nos terminais pré-sinápticos, o que leva ao aumento na sua concentração no espaço sináptico. Entretanto, atualmente, são fármacos menos utilizados para o tratamento da depressão, devido ao seu perfil de efeitos colaterais, uma vez que possuem menor seletividade que os demais fármacos (Abdallah *et al.*, 2018).

Estes efeitos indesejáveis são devidos, pelo menos em parte, a ação dos ADTs como antagonistas competitivos dos receptores pós-sinápticos adrenérgicos, muscarínicos e histamínicos (Moraczewski; Aedma, 2020), o que favorece o aparecimento de efeitos como tontura, sonolência, hipotensão arterial (receptor alfa-1 adrenérgico), visão turva, aumento do apetite, sedação, ganho de peso (receptor H1) (Cleare *et al.*, 2015), podendo ainda ser letais em altas doses (MAGGIONI *et al.*, 2008).

Os Inibidores da Monoamina Oxidase (IMAO), por sua vez, possuem como alvo a enzima monoamina oxidase, a qual é responsável por metabolizar NT monoaminérgicos. Ao inibirem esta enzima, seus níveis aumentam e há melhora sintomática da depressão. Entretanto, os IMAOs são dotados de diversos efeitos colaterais e de alta toxicidade, além de interagirem com diversos outros medicamentos e alimentos (Farach *et al.*, 2012; Abdallah *et al.*, 2018).

A segunda classe de antidepressivos possui um melhor perfil de efeitos colaterais e adversos e é composta pelos inibidores seletivos da recaptação de serotonina (ISRS) (GIBSON-Smith *et al.*, 2020). Dentre as principais classes de fármacos antidepressivos que atuam no ajuste de concentração de monoaminas, estão os ISRS como a fluoxetina, a sertralina, a paroxetina e o escitalopram. O alvo destes fármacos é o transportador de serotonina (5-HT) no neurônio pré-sináptico, atuando na inibição da recaptação 5-HT, fazendo com que haja aumento na sua concentração na fenda sináptica (De Deurwaerdere; Di Giovanni, 2021; Edinoff *et al.*, 2021).

Estes neurônios possuem projeções axonais por todo o cérebro e são responsáveis por controlar diversos processos cerebrais, incluindo as emoções, o sono, o comportamento sexual, o apetite e a percepção sensorial. Entretanto, mesmo com um melhor perfil de segurança, os ISRS também provocam alguns efeitos colaterais como insônia, náuseas, disfunção sexual e síndrome de abstinência quando interrompidos abruptamente (Olivier *et al.*, 2011; Gartlehner *et al.*, 2011)

Outras classes de antidepressivos que visam o reequilíbrio de monoaminas nas fendas sinápticas, são os Inibidores da Recaptação de Serotonina e Noradrenalina (IRSN), como a duloxetina, a venlafaxina e a desvenlafaxina, e os Inibidores da Recaptação de Noradrenalina e Dopamina (IRND), como a bupropiona (Van Poelgeest *et al.*, 2021). Estes fármacos apresentam eficácia comprovada para depressão e ansiedade, porém, apresentam menor tolerabilidade terapêutica (Baldwin *et al.*, 2014).

Além disso, o tratamento está associado com o desenvolvimento de hipertensão arterial e com o risco de desenvolver disfunção hepática (Bleakley; Davies *et al.*, 2014). Existem outros fármacos que também podem ser utilizados na terapia antidepressiva, como a mirtazapina, um antagonista alfa-2-adrenérgico central que aumenta a neurotransmissão noradrenérgica e serotoninérgica central, e a agomelatina, que age nos receptores de melatonina e noradrenalina (Marwaha *et al.*, 2023).

Classicamente, a terapia ansiolítica é representada pelos fármacos da classe dos benzodiazepínicos (BDZs) como, por exemplo, o diazepam, que são moduladores alostéricos positivos do receptor de ácido gama-aminobutírico tipo A (GABA<sub>A</sub>). Esta ação favorece um aumento na condutância do íon Cl<sup>-</sup> através do seu canal, promovendo hiperpolarização de membrana e diminuição da propagação de impulsos nervosos (Baker *et al.*, 2021; Roper *et al.*, 2022). Este receptor é frequentemente associado à regulação de processos emocionais, como os quadros de ansiedade (Kim; Hibbs, 2021). Entretanto, apesar da eficácia dos BDZs, estes fármacos causam efeitos indesejáveis, como sedação, amnésia, dependência, relaxamento muscular e abstinência, o que prejudica a adesão terapêutica (Maust; Lin; Blow, 2019).

Além dos BDZs, cronicamente, os ISRS também são utilizados no tratamento da ansiedade, demonstrando grande eficácia farmacológica com o passar dos anos, a exemplo do escitalopram e a fluoxetina, os quais proporcionam um aumento na concentração de serotonina (5-HT) nas fendas sinápticas. Ultimamente, esta alternativa terapêutica está tomando bastante espaço no tratamento do TAG, em função da associação do TAG com a depressão, além do perfil de efeitos colaterais e da segurança da classe. Os BDZ, a exemplo do diazepam, clonazepam e alprazolam, são muito utilizados em associação com os ISRS para o tratamento de crises agudas de ansiedade e pânico (Baldwin *et al.*, 2014; Thibaut, 2017; Harro, 2018).

Os principais problemas envolvidos com a terapia farmacológica antidepressiva e ansiolítica estão centrados na adesão ao tratamento. Em primeira instância, existe um retardo de semanas até o início da aparição de melhora sintomática, além de uma vasta gama de efeitos colaterais e adversos, que acabam diminuindo a qualidade de vida do paciente (Oliva *et al.*, 2021). Outros problemas estão relacionados às restrições de atividades de rotina, por conta de efeitos sedativos ou por interação fármaco-nutriente ou com álcool. O abandono sem desmame também gera síndrome de abstinência, por serem fármacos psicotrópicos de uso crônico (Van Poelgeest *et al.*, 2021).

#### 2.4.1 Plantas medicinais e óleos essenciais no tratamento de transtornos mentais

As plantas medicinais são fontes de compostos químicos biologicamente ativos reconhecidas há milênios por seus diversos benefícios terapêuticos (Zhang *et al.*, 2021; Fernandes *et al.*, 2021). Este conhecimento a respeito do potencial terapêutico de plantas medicinais é milenar e vem da cultura dos povos antigos e de várias tribos indígenas. Diversas são as espécies

que já possuem atividade biológica comprovada cientificamente, por possuírem fitoconstituintes em seus óleos essenciais, os quais são divididos em dois grandes grupos: terpenos e fenilpropanoides, além de outros componentes como aldeídos, ésteres, cetonas e álcoois estão presentes e conferem a complexidade aromática dos óleos essenciais (Bianchini *et al.*, 2017; Santos *et al.*, 2019).

Os óleos essenciais (OE) são substâncias odoríferas formadas a partir do metabolismo secundário dos vegetais para a sua proteção contra ataques predatórios e de agentes polinizadores, por exemplo. Os seus componentes são formados a partir de três vias biossintéticas: a via do fosfato metileritritol (MEP), que leva aos monoterpenos e diterpenos; a via do ácido mevalônico, dando origem aos sesquiterpenos; e por último, a via do ácido chiquímico levando a formação dos fenilpropanoides. Tais compostos são responsáveis pelas propriedades biológicas das plantas aromáticas e medicinais (Derangeon *et al.*, 2010).

A via do mevalonato inicia-se com a conversão do acetil-CoA em 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA), através de uma série de reações enzimáticas. A partir da formação de HMG-CoA, há a conversão em mevalonato, que é uma etapa-chave para a formação dos terpenos. O mevalonato é, portanto, convertido em isopentenil-pirofosfato (IPP) e dimetilalil-pirofosfato (DMAPP), unidades de construção fundamentais para a síntese dos terpenoides. Estas unidades são condensadas e modificadas por uma série de enzimas específicas para formar diferentes terpenos (Bianchini *et al.*, 2017; Santos *et al.*, 2019). Os terpenos representam a maior classe de fitoconstituintes de óleos essenciais e diversos são os seus derivados que apresentam atividade no tratamento de transtornos mentais, sobretudo nos transtornos de ansiedade e depressão (Rosenkranz *et al.*, 2021).

A utilização de OE é bastante difundida, uma vez que esse fitocomplexo está presente na maioria dos produtos utilizados pelos homens, sendo os ingredientes principais de cosméticos, perfumes para o corpo e o cabelo, produtos para a higiene, soluções antissépticas orais e cremes dentais. São empregados também na aromaterapia a qual se baseia no uso de óleos essenciais, que, devido à sua capacidade de serem facilmente absorvidas pela pele, são utilizados para o alívio dos sintomas de diversas doenças, principalmente as que atingem o sistema nervoso central (Kaufman *et al.*, 2016; Fernandes *et al.*, 2021).

Os monoterpenos, em particular, são alvos de muitas pesquisas, e constituem 90% dos óleos essenciais, são voláteis, aromáticos e pertencem a um grupo diverso de compostos quí-

nicos, com enorme variedade de estruturas e com implicações em diversas atividades biológicas, dentre elas, ações sedativas, anticonvulsivantes, hipnóticas, hipotérmicas, efeitos antiespasmódicos, vasorrelaxantes e atividade antinociceptiva (Richardson-Jones *et al.*, 2011).

A variedade química encontrada nos OE, provendo compostos puros a exemplo do limoneno, citral, citronelal, eugenol, mentol e safrol e linalol, pode ser responsável pela ampla variedade de atividades farmacológicas, dentre essas, atividade ansiolítica (Richardson-Jones *et al.*, 2011), antidepressiva (Garcia-Garcia; Newman-Tancredi; Leonardo, 2014) anticonvulsivante (Richardson-Jones *et al.*, 2011; Rombolà *et al.*, 2020) e antinociceptiva (Spiacci *et al.*, 2016) e, possivelmente, os vários mecanismos de ação pelos quais essas substâncias atuam. A partir das moléculas dos constituintes ativos dos OE diversas mudanças de grupamentos moleculares e análise de relação entre estrutura química e ação farmacológica têm sido feitas com a finalidade de se desenvolver novos fármacos, com maior eficácia, seletividade e segurança (File; Gonzalez; Andrews, 1996; Fernandes *et al.*, 2021).

#### **2.4.1.1 Linalol e o tetrahidrolinalol**

O linalol é um exemplo de terpeno da subclasse dos monoterpenos. É um composto orgânico aromático encontrado em diversas plantas, mas principalmente nos óleos essenciais de plantas como a lavanda (*Lavandula* spp.), o manjeriço (*Ocimum basilicum*) e o alecrim (*Rosmarinus officinalis*) (Stashenko, 2008; Dos Santos, 2018). É um fitoquímico conhecido pelo seu aroma floral e por suas diversas aplicações terapêuticas, sobretudo a nível de SNC, como os potenciais sedativo, ansiolítico e antidepressivo (Cheng; Sheen; Chang, 2015).

O linalol é um monoterpeno de cadeia aberta existentes sob duas formas enantioméricas (R)- (-)-linalol e (S)- (+)-linalol. Esse metabólito secundário mostra-se ponto comum na biossíntese de derivados álcoois e aldeídos que são formados a partir da ação enzimática da linalol sintetase (acetato de linalol e óxidos de linalol) e de enzimas do citocromo P-450 (8-oxolinalol, 8-hidroxilinalol e 8-carboxilinalol) (Guzmán-Gutiérrez, 2015). O linalol também sofre processos de acetilação, seguido de oxidações dando origem a metabólitos como o acetato de 8-hidroxilinalila, acetato de 8-oxolinalila e acetato de 8-carboxilalila. Por fim, reações de desidrogenação, são estabelecidas a partir do linalol, podendo-se obter como produto final, a partir da síntese ou biossíntese, o tetrahidrolinalol (Lapczynski *et al.*, 2008) (Figura 5).

Comumente, em razão das suas fragrâncias, o linalol e seus derivados são utilizados na indústria de perfumes (Lapczynski *et al.*, 2008; Belsito *et al.*, 2010) Atualmente, pesquisas

têm demonstrado que esses compostos, por apresentarem baixo peso molecular e alta lipofilia podem atravessar a barreira hematoencefálica, sendo assim, empregados como terapias farmacológicas, melhorando sono, alterações comportamentais, humor e cognitivas, o que os tornam potenciais agentes para o tratamento de doenças neurológicas e psiquiátricas, modulando diversos circuitos cerebrais (Harada *et al.*, 2018).

Evidências tem demonstrado que o linalol desempenha papéis neuroprotetores, minimizando a neuroinflamação e o estresse oxidativo em distúrbios neurodegenerativos como Parkinson e Alzheimer, denotando sua ação sobre o Sistema Nervoso Central (Harada *et al.*, 2018; Ostrowska *et al.*, 2018). Estudos sugeriram que esse monoterpene aumenta a respiração mitocondrial por um mecanismo protetor frente a hiperestimulação glutamatergica, reduzindo processos apoptóticos (Guzmán-Gutiérrez *et al.*, 2015). Demais pesquisas *in vitro* com o linalol reforça seu potencial anti-inflamatório central, pela supressão sinalizações inflamatórias induzidas pela via NFkB, reduzindo a produção de citocinas, óxido nítrico e espécies reativas de oxigênio (Bal-Price; Brown, 2001; Miller; Raison, 2016)

De acordo com Dos Santos et al. (2018), os óleos essenciais das folhas de *Aniba roseodora* (pau-rosa), *Aniba parviflora* (macacaporanga) e *Aeollanthus suaveolens* (catinga-de-mulata) apresentaram atividade antidepressiva significativa possivelmente em razão da presença do linalol na composição do OE. Os resultados não indicaram comprometimento motor espontâneo e retenção de memória dos roedores. Com relação a atividade ansiolítica do linalol, alguns estudos examinaram seu potencial, evidenciando efeitos promissores em modelos comportamentais clássicos por mecanismo via transmissão Gabaérgica, desencadeado pela entrada olfativa evocada pelo seu odor (Harada *et al.*, 2018).

O efeito ansiolítico-símile do óleo essencial de folhas de *Cinnamomum osmophloeum* ct, rico em linalol, foi estudado por Cheng, Sheen e Chang (2015), que relacionaram o potencial ansiolítico do óleo à redução de neurotransmissores como serotonina, dopamina e noradrenalina. Neste estudo, os resultados sugerem que ambos enantiômeros do linalol S (-) e S (+) possuem propriedades ansiolíticas sem efeitos colaterais nos modelos *in vivo*.

Essas evidências tornam o linalol um agente farmacologicamente interessante na modulação das respostas ansiolíticas e antidepressivas, permitindo o direcionamento e a extensão desses estudos com seus derivados. O tetrahidrolinalol (THL) (3,7-dimetiloctan-3-ol) é um monoterpene álcool cíclico, produzido durante o metabolismo do linalol, ou obtido sinteticamente através de uma reação de hidrogenação da ligação dupla endocíclica (Figura 5) (Belsito *et al.*,



um critério de validade (previsibilidade, semelhança e homologia), sobretudo no campo da psicofarmacologia (Nunes; Hallak, 2014; Zmudzka *et al.*, 2018).

A previsibilidade se refere a capacidade que o teste possui de reproduzir o efeito da droga observado na clínica no animal, de acordo com parâmetros pré-determinados entendidos como sinais ou sintomas; já semelhança é a capacidade do modelo de apresentar uma mudança no comportamento do animal que seja compatível com as manifestações clínicas do transtorno psiquiátrico; e, por fim, a homologia se refere à capacidade do modelo de mimetizar os processos neuroquímicos e psicobiológicos envolvidos na fisiopatologia do transtorno. Portanto, a maioria dos modelos obedece ao critério de previsibilidade e os fármacos usados na clínica são utilizados como padrão positivo em condições experimentais (Goodarzi *et al.*, 2019).

Somados aos modelos animais, a pesquisa não-clínica também conta com modelos computacionais (*in silico*) preditivos que são fundamentais para direcionar melhor os estudos antes de fazer a utilização de animais. Os testes *in silico* permitem estimar as propriedades físico-químicas, farmacocinéticas e tóxicas (ADMET) e farmacodinâmicas de uma droga nova, o que possibilita avaliar a viabilidade da utilização desta mesma droga em modelos animais e, conseqüentemente, em humanos (Pinzi; Rastelli, 2019).

O estudo de *docking* molecular vem sendo utilizado desde a década de 1980 com o principal objetivo de realizar um *screening* com bancos de moléculas candidatas a um determinado potencial farmacológico. Com o *docking*, é possível estudar a viabilidade de ligação de uma dada molécula à outra, estruturalmente (modos de ligação) e energeticamente (afinidade de ligação). Usualmente, é empregado para ligação da molécula à proteínas-alvo importantes, como receptores e enzimas, mas pode ser utilizado para complexos com ácidos nucléicos ou carboidratos, por exemplo (Yang *et al.*, 2020; Stanzione; Giangreco; Cole, 2021).

### 2.5.1 Modelos animais de ansiedade

Os modelos animais de ansiedade buscam provocar no animal uma reação de medo e que corrobore para a diminuição do comportamento exploratório natural de um novo ambiente, ao imitar uma situação ambiental que induz aversão ou desconforto na espécie, como lugares elevados ou com grande exposição (Kraeuter; Guest; Sarnyai, 2019; Himanshu *et al.*, 2020). As reações dos animais são padrões comportamentais que são utilizados como medidas de ansiedade, o que caracteriza uma análise etológica, ou etofarmacológica (Neumann *et al.*, 2011; Cruz; Landeira-Fernandez, 2012).

Um importante teste é o campo aberto, que permite a análise de parâmetros de locomoção para avaliar a atividade exploratória geral dos roedores. Neste teste, podemos inserir alguns parâmetros que são compreendidos como medidas de ansiedade. O teste se fundamenta no conflito existente entre a motivação em explorar um novo ambiente versus a aversão a ambientes novos e abertos, onde os roedores estão mais expostos (Knight *et al.*, 2021). Na natureza, isso poderia indicar uma maior susceptibilidade do roedor a se deparar com um predador inesperado e, portanto, isso gera nele um conflito e reduz a sua atividade exploratória, o que é entendido experimentalmente como um comportamento de ansiedade (Kraeuter; Guest; Sarnyai, 2019; Himanshu *et al.*, 2020). Drogas com perfil ansiolítico tendem a favorecer uma maior exploração na área central do aparato, longe das proteções da periferia, enquanto que drogas com perfil ansiogênico tendem a diminuir a exploração central (Antiorio *et al.*, 2022).

De modo semelhante, o Labirinto em Cruz Elevado (LCE), desenvolvido inicialmente por Montgomery e colaboradores (1955) é tido como padrão-ouro no estudo de drogas com potencial ansiolítico do tipo benzodiazepínico, por atender aos critérios de previsibilidade e semelhança. O modelo se baseia na aversão natural de roedores frente a ambientes abertos e elevados (Kraeuter; Guest; Sarnyai, 2019). Os comportamentos incitados no LCE são equivalentes à neofobia, caracterizando, assim, um modelo de conflito comportamental não-condicionado (Neumann *et al.*, 2011). Dessa forma, os parâmetros analisados no LCE são medidas espaço-temporais, como número de entradas e tempo de permanências nos braços abertos do aparato (Knight *et al.*, 2021).

De forma semelhante, o modelo de transição claro/escuro também se baseia na neofobia dos roedores, desta vez frente a ambientes novos e iluminados, nos quais eles estão mais expostos. Da mesma forma, os parâmetros analisados são espaço-temporais, como número de entradas e tempo de permanência no compartimento claro do aparato (Cruz; Landeira-Fernandez, 2012; Himanshu *et al.*, 2020). Outros tipos de modelos se baseiam em respostas condicionadas, como o modelo da resposta condicionada de congelamento (“*freezing*”), o do sobressalto intensificado pelo medo e os modelos de resposta ativa e resposta passiva são menos utilizados atualmente, mas também apresentam boa reprodutibilidade (Hughes, 2019; Martins, 2019).

### 2.5.2 Modelos animais de depressão

Os modelos animais de depressão se baseiam na indução da depressão através de estímulos estressores cronicamente, ou na observação aguda do comportamento de “desistência”

frente a uma situação em que o animal não encontra uma escapatória (Czéh *et al.*, 2016; Ruiz; Calliari; Pautassi, 2018). Na avaliação aguda do comportamento depressivo, um modelo que se destaca é o do Nado Forçado, no qual os animais são colocados em um cilindro de água onde não conseguem tocar o fundo com as patas. Os pesquisadores, então, medem o tempo que os animais passam nadando antes de entrar em um estado de imobilidade flutuante, que é considerado um comportamento depressivo, por refletir a desistência da fuga ao perceber que esta é impossível (Antkiewicz-Michaluk *et al.*, 2014). A administração de antidepressivos tende a aumentar o tempo de natação e reduzir o tempo de imobilidade, sugerindo um efeito antidepressivo (Czéh *et al.*, 2016; Harro, 2019).

Outro importante modelo, o teste da suspensão da cauda, também se baseia na imobilidade do animal. No teste da suspensão da cauda, os animais são suspensos pela cauda, o que induz um comportamento de imobilidade. A administração de antidepressivos pode reduzir o tempo de imobilidade nesse Teste (Planchez; Surget; Belzung, 2019). Estes modelos comportamentais são fundamentais para avaliar a ação aguda da substância em reverter este parâmetro comportamental definido operacionalmente como indicativo de comportamento depressivo e, também, para fazer associações farmacológicas que ajudam a compreender o mecanismo de ação das drogas antidepressivas (Song; Kim, 2021).

Cronicamente, é possível induzir a depressão nos roedores através da exposição destes animais a estímulos estressores ou situações ameaçadoras sem escapatória. No modelo de estresse crônico, há a exposição dos animais a estressores crônicos, como privação de sono, isolamento social ou restrição de alimentos. Os animais desenvolvem sintomas semelhantes à depressão, como anedonia (perda de interesse em atividades prazerosas). A administração de antidepressivos pode reverter esses sintomas (Katz; Roth; Carroll, 1981; Franceschelli *et al.*, 2014).

Há também o modelo da anedonia, no qual os animais são treinados para consumir uma solução açucarada ou outra recompensa e, em seguida, são submetidos a situações de estresse ou crise. A diminuição do consumo da recompensa é um indicativo de anedonia, um sintoma da depressão. Antidepressivos que restauram o consumo da recompensa podem ser considerados eficazes (Papp *et al.*, 2017). Esta indução crônica da depressão também pode ser feita com a utilização de fármacos, como a reserpina, a dexametasona ou o próprio lipopolissacarídeo (LPS) que atuam por diferentes vias para induzir o comportamento depressivo (Antkiewicz-Michaluk *et al.*, 2014; Ruiz; Calliari; Pautassi, 2018; Hao *et al.*, 2019).

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Investigar o efeito ansiolítico-símile e antidepressivo-símile do monoterpene tetrahidrolinalol por meio de abordagens *in vivo* e *in silico*.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- a) Estimar a DL<sub>50</sub> oral e os efeitos gerais do monoterpene tetrahidrolinalol por meio de um *screening* farmacológico comportamental;
- b) Realizar análises histopatológicas dos órgãos (baço, coração, fígado, pulmão, rins e cérebro) dos animais submetidos ao protocolo de toxicidade aguda;
- c) Avaliar o potencial ansiolítico-símile do monoterpene tetrahidrolinalol por meio do modelo de labirinto em cruz elevado;
- d) Avaliar o potencial antidepressivo-símile do monoterpene tetrahidrolinalol por meio do modelo de natação forçada;
- e) Prever o potencial farmacológico em alvos relacionados a atividade ansiolítica e antidepressiva através de metodologias *in silico* de modelagem molecular;
- f) Predizer as características farmacocinéticas e físico-químicas do monoterpene tetrahidrolinalol por meio das plataformas eletrônicas SwissADME e pkCSM;
- g) Investigar o envolvimento da via glutamatérgica, dopaminérgica e oxidonitrérgica no efeito antidepressivo-símile do tetrahidrolinalol no modelo de natação forçada;
- h) Investigar o efeito do tetrahidrolinalol sobre a concentração de nitrito no hipocampo e córtex pré-frontal de camundongos submetidos ao modelo de natação forçada;
- i) Sugerir um possível mecanismo de ação para os efeitos do tetrahidrolinalol.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Local de pesquisa, aspectos éticos e animais

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Uso Animal da Universidade Federal da Paraíba, sob certidão nº 6479250620, com período de vigência de 08/2020 a 03/2024 (Anexo A). Os testes farmacológicos foram desenvolvidos no Laboratório de Psicofarmacologia da Universidade Federal da Paraíba, sob orientação do Prof. Dr. Cícero Francisco Bezerra Felipe e coorientação do Prof. Dr. Reinaldo Nóbrega de Almeida e os testes *in silico* pelo Laboratório de Químioinformática, coordenado pela Profa. Dra. Luciana Scotti e pelo Prof. Dr. Marcus Tullius Scotti.

Foram utilizados camundongos albinos *Swiss (Mus musculus)* adultos machos, para avaliação farmacológica e fêmeas para estimar a  $DL_{50}$ , pesando entre 25 e 35g, obtidos da Unidade de Produção Animal do Instituto de Pesquisa de Fármacos e Medicamentos (IPeFarm) da Universidade Federal da Paraíba. No biotério, os animais foram mantidos em gaiolas plásticas, sob temperatura e umidade ambiente ( $23 \pm 2^\circ\text{C}$ ), respeitando-se o ciclo claro-escuro de 12h, alimentando-se com ração e água *ad libitum*. Todos os estudos foram executados entre 12:00 e 17:00 p.m, em estrita conformidade com as recomendações do Guia para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório dos Institutos Nacionais de Saúde e do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal.

Para reduzir o sofrimento dos animais foram respeitados os tempos limites de exposição do animal aos estímulos dos testes. Após o período experimental, os camundongos foram pré-anestesiados com tiopental ( $100 \text{ mg kg}^{-1}$ ), e anestesiados com lidocaína ( $10 \text{ mg kg}^{-1}$ ) por via intraperitoneal, em dose suficiente para eliminar o reflexo corneal (CONCEA Nº37/2018). Todos os procedimentos desde o início do estudo até o momento de eutanásia foram realizados para evitar o sofrimento, reduzir o desconforto e dor dos animais.

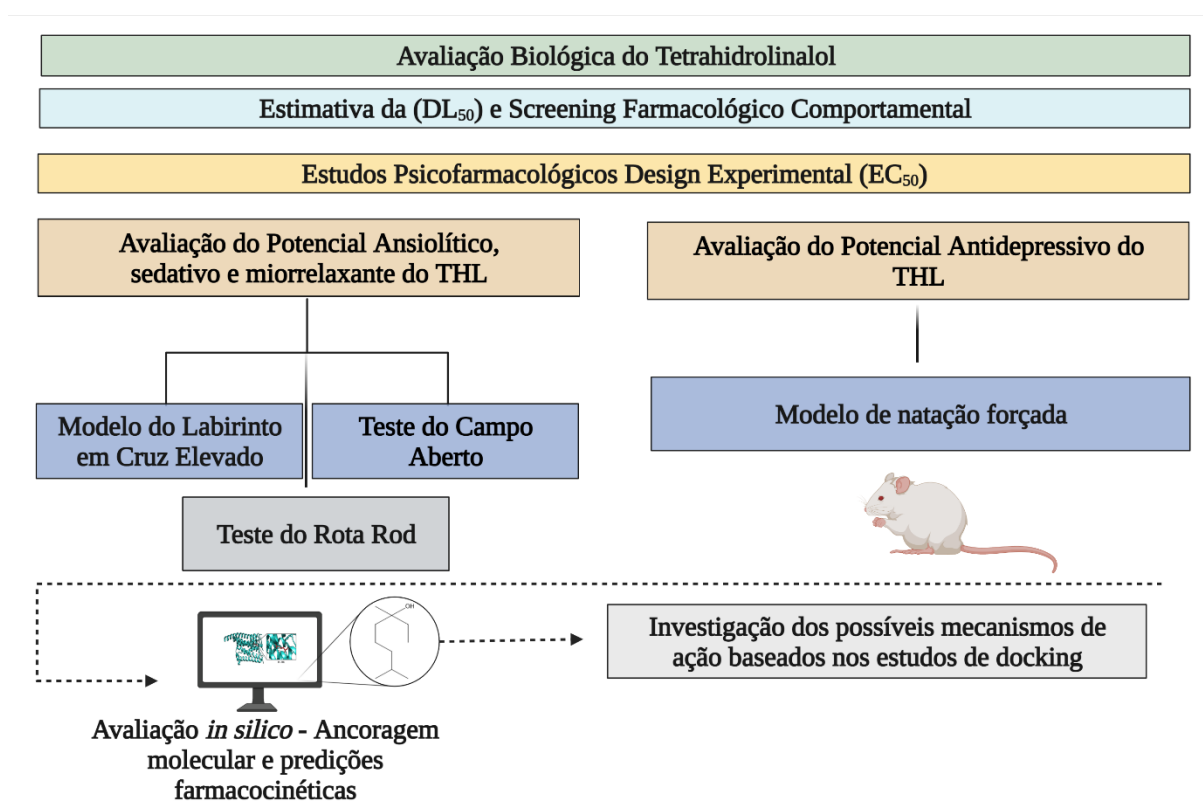
#### 4.1.1 Drogas, Fármacos e Reagentes

Azul de Metileno (Sigma, St. Louis, MO, EUA), Cloridrato de Dextrocetamina (Cristália, Brasil), Cloridrato SCH 79797 (Sigma, St. Louis, MO, EUA), Diazepam (Cristália, Brasil), Imipramina (EMS, Brasil), L-arginina (Sigma, St. Louis, MO, EUA), L-name (Sigma, St. Louis, MO, EUA), Tetrahidrolinalol (Sigma, St. Louis, MO, EUA) e Tween 80 (Química Nova,

Brasil). As doses e períodos de administração das drogas foram estabelecidas de acordo com a literatura e protocolos padronizados no laboratório de Psicofarmacologia. Quanto a preparação das substâncias, estas foram solubilizadas Tween 80 a 0,5% em NaCl 0,9 %.

#### 4.1.2 Delineamento da Pesquisa e Protocolos experimentais

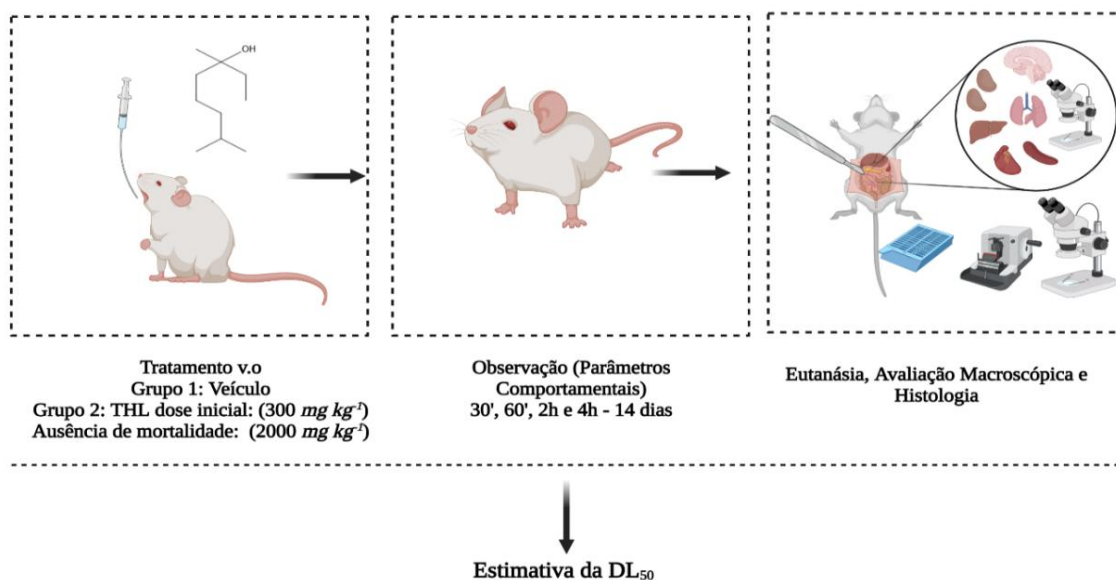
A sequência de metodologias que foram utilizadas para a avaliação das atividades ansiolítica e antidepressiva símile do THL está apresentada na figura abaixo (Figura 6).



**Figura 6.** Desenho esquemático dos testes realizados para o estudo do potencial biológico do THL *in vivo* – estimativa da DL<sub>50</sub> e investigação psicofarmacológica dos efeitos ansiolítico-símile e antidepressivo-símile. Estudos *in silico* empregando técnicas de ancoragem molecular em alvos específicos envolvidos na fisiopatologia da ansiedade e depressão e previsões farmacocinéticas. Fonte: autoria/Biorrender (2023).

#### 4.1.2.1 Estimativa da $DL_{50}$ e Screening farmacológico Comportamental

A estimativa da  $DL_{50}$  oral foi realizada segundo a metodologia descrita no Protocolo 423 das diretrizes da OECD (*Organization for Economic Cooperation and Development*) com adaptações. O grupo controle foi tratado com veículo (Tween 80 a 0,5% em NaCl 0,9%) e o grupo experimental do THL foi tratado inicialmente com a dose de  $300\text{ mg kg}^{-1}$ , v.o. Após os tratamentos, os animais foram observados durante 30 min, 1, 2 e 4 horas para que se identificassem comportamentos ou mesmo alterações sugestivas de atividade farmacológica no SNC, utilizando como parâmetro de triagem farmacológica comportamental o protocolo de Almeida et al. (1999) (Anexo B) (Figura 7). Em seguida, a avaliação foi realizada a cada 24h, durante 14 dias. Devido à ausência de morte e de sinais característicos de toxicidade, a dose do composto foi aumentada para  $2000\text{ mg kg}^{-1}$  conforme preconizado pelo protocolo. Para ambos os grupos, no décimo quarto dia, os animais foram pesados, eutanasiados com uma injeção de anestésicos, como recomendado pelas Diretrizes da Prática de Eutanásia do CONCEA de 2018, sendo os órgãos (fígado, baço, coração, rins e cérebro) retirados, pesados e avaliados macroscopicamente e microscopicamente.

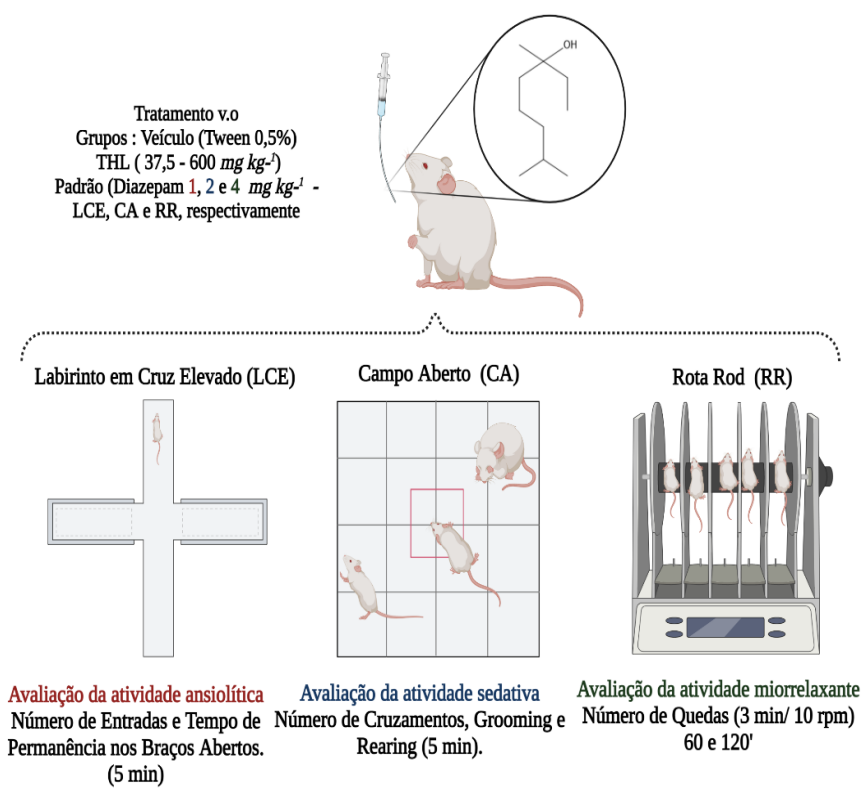


**Figura 7.** Desenho esquemático do ensaio não-clínico da estimativa da  $DL_{50}$  oral segundo o protocolo da OECD. Administração do THL inicialmente na dose de  $300\text{ mg kg}^{-1}$  e posteriormente na dose de  $2000\text{ mg kg}^{-1}$ , período de observação comportamental (30, 60, 2 e 4h – 14 dias) e eutanásia para retiradas dos órgãos para análises histopatológicas. Fonte: autoria/Bior-render (2023).

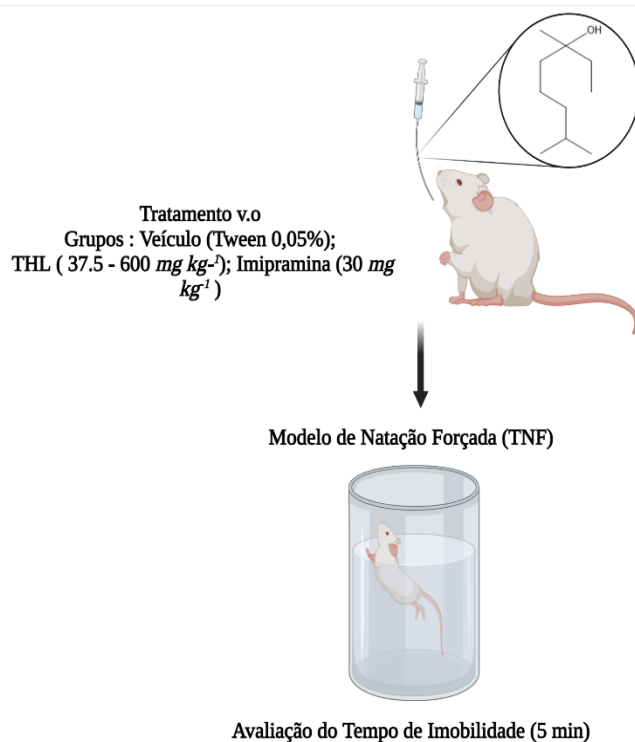
#### 4.1.2.2 Estudos comportamentais – Design Experimental

Camundongos foram distribuídos aleatoriamente em grupos distintos (n=6) para determinação da melhor dose responsável pelo efeito. Sendo assim, O THL foi administrado oralmente nas doses de 37,5, 75, 150, 300 e 600  $mg\ kg^{-1}$ . Essas doses foram escolhidas com base nos estudos de toxicidade anteriormente descrito e a partir de dados da literatura. O grupo controle recebeu veículo (Tween 80 a 0,5% em NaCl a 0,9%, v.o.) e como padrão para o efeito ansiolítico, sedativo e miiorrelaxante utilizou-se o diazepam, respectivamente, nas doses de 1, 2 e 4  $mg\ kg^{-1}$  i.p. Decorridos 30 minutos do tratamento com o padrão e 60 minutos com o THL os animais foram submetidos ao modelo de labirinto em cruz elevada e aos testes de campo aberto e *rota rod* (Figura 8A), separadamente. Para avaliação da atividade antidepressiva-símile do THL foram utilizadas as mesmas doses dos grupos experimentais anteriormente citados e como padrão a imipramina (30  $mg\ kg^{-1}$  i.p). Após 30 ou 60 min dos tratamentos os animais foram submetidos ao modelo de natação forçada (Figura 8B).

(A)



(B)



**Figura 8.** Desenho esquemático dos estudos comportamentais – Design Experimental (THL 37,5 – 600  $mg\ kg^{-1}$ ) (A) Atividade ansiolítica-símile. – Labirinto em cruz elevado (parâmetros analisados: tempo e número de entradas nos braços abertos; investigação da atividade sedativa – Campo aberto (parâmetros analisados: número de cruzamentos, grooming e rearing); investigação da atividade miorelaxante – *Rota Rod* (parâmetro avaliado: número de quedas no aparelho durante 3 min em 10 rpm) (B) Atividade antidepressiva-símile – modelo do nado forçado (parâmetro avaliado: tempo de imobilidade, ausência de comportamentos ativos). Fonte: autoria/Biorrender (2023).

#### 4.1.2.3 Atividade ansiolítica

##### 4.1.2.3.1 Modelo do labirinto em cruz elevado (LCE)

A avaliação dos efeitos ansiolíticos da substância foi investigado de acordo com a metodologia proposta por Handley e Mithani (1984). Após os tratamentos, os animais individualmente foram levados ao LCE e posicionados no centro do aparelho, com o focinho voltado para um dos braços fechados. O aparato do LCE consiste em uma estrutura formada por dois braços abertos (30 cm x 5 cm) dispostos de forma perpendicular a dois braços fechados (30 cm

x 15 cm x 5 cm), conectados a uma plataforma central (5 cm x 5 cm) com elevação de 45 cm do solo. Como parâmetros comportamentais foram avaliados o número de entrada e o tempo de permanência dos animais nos braços abertos, durante 5 minutos. O critério estabelecido para visita ao braço se deu quando o animal movia suas quatro patas dentro dos limites da plataforma (Murtala; Akindele, 2020). Ao final de cada teste, o aparelho foi limpo com uma solução de álcool a 10%, antes do próximo animal, eliminando os odores que por ventura poderia influenciar no seu comportamento.

#### 4.1.2.3.2 *Teste do Campo Aberto*

Os animais foram submetidos ao teste do campo aberto, onde se foi avaliado a exploração individual espontânea e a sua atividade motora (ARCHER, 1973). O campo aberto constitui uma arena circular confeccionada de acrílico transparente (30 cm x 30 cm) com piso branco/opaco (30 cm x 30 cm x 15 cm), dividido em doze seções dispostas em dois círculos concêntricos. Durante 5 minutos foram registrados os seguintes parâmetros: frequência de locomoção ou número de cruzamentos nos quadrantes, número de levantamentos ou *rearing* (levantamento do animal sobre as patas traseiras), número de autolimpeza ou *grooming* (Prut; Belzung, 2003; Rios *et al.*, 2020). Assim como no LCE, o aparelho também foi limpo periodicamente com uma solução de etanol a 10% após cada animal testado.

#### 4.1.2.3.3 *Teste do rota rod*

Para avaliar os possíveis efeitos não específicos de relaxamento muscular dos compostos, os animais foram submetidos ao teste do *rota rod*. O aparelho (Insight, Ribeirão Preto, Brasil) consiste em uma barra giratória com diâmetro de 3 cm, elevado à 30 cm do piso. Os animais foram colocados na haste rotativa, com velocidade rotacional de 10 rpm. O tempo de permanência na barra giratória, em segundos, e o número de quedas foram os parâmetros avaliados.

#### **4.1.2.4 Atividade antidepressiva**

##### **4.1.2.4.1 Modelo de Natação Forçada**

Após os tratamentos, os animais foram submetidos ao modelo da natação forçada de acordo com Porsolt (1977). Neste modelo, os animais foram inseridos em um cilindro de acrílico (25 cm de altura, 10 cm de diâmetro) contendo 8 cm de água em temperatura ambiente ( $24 \pm 2$  °C). O tempo de imobilidade foi o parâmetro avaliado, sendo caracterizado pela ausência de comportamentos ativos de nado.

#### **4.1.3 Ensaios *in silico***

##### **4.1.3.1 Alinhamento de sequências proteicas**

As sequências de quatro proteínas que não contém estruturas 3D no Protein Data Bank (PDB <https://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>) (BERNSTEIN et al., 1978) foram obtidas no banco de dados GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)(Bernstein *et al.*, 1978). Essas proteínas foram: transportador de Noradrenalina (NP\_001165975.1) e receptor  $\alpha_{2B}$  (NP\_000673.2). Em seguida, foi realizado um alinhamento global com a sequência de uma proteína com estrutura tridimensional conhecida, usando a ferramenta da web Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>), que alinha todas as sequências proteicas inseridas por um usuário. O alinhamento facilitou a investigação do sítio ativo e a determinação da similaridade e a identidade compartilhada entre as proteínas.

##### **4.1.3.2 Modelagem por homologia**

As sequências alvo foram obtidas como sequências de aminoácidos no formato FASTA foram importadas no site Swiss Model (<https://swissmodel.expasy.org/>) (Waterhouse *et al.*, 2018). Para cada molde identificado, a qualidade foi prevista a partir de recursos de alinhamento, como ProMod3, QMEAN e GMQE. A qualidade estereoquímica dos modelos foram avaliadas pelo servidor da Web PSVS (suíte de software de validação de estrutura de proteínas) ([http://psvs-1\\_5-dev.nesg.org/](http://psvs-1_5-dev.nesg.org/)), usando Procheck (Laskowski *et al.*, 1993). O Procheck gera

um gráfico Ramachandran, que determina as regiões permitidas e não permitidas da cadeia principal de aminoácidos (Lovell *et al.*, 2003).

#### 4.1.4 Docking molecular

O docking molecular foi utilizado para investigar o mecanismo de ação do monoterpene tetrahidrolinalol (THL) que contribua para efeito ansiolítico e antidepressivo através da afinidade de ligação dos compostos e as enzimas selecionadas no estudo. Para isso foi realizado um rastreio com diversas proteínas envolvidas para esses efeitos. As estruturas 3D das enzimas foram obtidas do Protein Data Bank (PDB) ([https://www.rcsb.org/pdb /home/home.do](https://www.rcsb.org/pdb/home/home.do)) (Bernstein *et al.*, 1978). As proteínas selecionadas e informações detalhadas sobre elas podem ser visualizados na Tabela 1. Inicialmente, todas as moléculas de água foram removidas da estrutura cristalina e o desvio quadrático médio (RMSD) foi calculado a partir das posturas, indicando o grau de confiabilidade do ajuste. O RMSD fornece o modo de conexão próximo à estrutura experimental e é considerado bem-sucedido se o valor for inferior a 2,0 Å.

##### 4.1.4.1 *Molegro Virtual Docker (MVD) 6.0*

Foi utilizado o software Molegro Virtual Docker v.6.0.1 (MVD) com os parâmetros predefinidos no mesmo software. O ligante complexado foi usado para definir o sítio ativo. Em seguida, os compostos foram importados, para analisar a estabilidade do sistema através das interações identificadas com o sítio ativo da enzima, tomando como referência o valor energético do MolDock. O algoritmo MolDock SE (Simplex Evolution) foi usado com os seguintes parâmetros: um total de 10 execuções com um máximo de 1.500 iterações usando uma população de 50 indivíduos, 2.000 etapas de minimização para cada resíduo flexível e 2.000 etapas de minimização global por corrida. A função de pontuação MolDock Score (GRID) foi usada para calcular os valores de energia de encaixe. Um GRID foi fixado em 0,3 Å e a esfera de busca foi fixada em 15 Å de raio. Para a análise da energia do ligante, foram avaliadas as interações eletrostáticas internas, ligações de hidrogênio internas e torções  $sp^2$ - $sp^2$ .

**Tabela 1.** Informações sobre as proteínas selecionadas no estudo de docking:

Proteína	PDB ID/Homologia	Ligante	Resolução
1. Transportador de Serotonina	5I73	Escitalopram	3.24 Å
2. Transportador de Noradrenalina	Homologia	Atomoxetina	-
3. Óxido nítrico sintase neuronal	5UO1	L-name	1.90 Å
4. Guanilato ciclase solúvel	3UVJ	Azul de Metileno	2.08 Å
5. Receptor NMDA	4PE5	Cetamina	3.96 Å
6. Inibidor de TNF- $\alpha$	2AZ5	Ligante PDB	2.10 Å
7. Inibidor de IL-6	1ALU	Metotrexato	1.90 Å
8. Receptor D <sub>1</sub>	7CKX	Cloridrato SHC	3.54 Å
9. Receptor D <sub>2</sub>	6CM4	Risperidona	2.87 Å
10. Receptor $\alpha_{2A}$	6KUY	Prazosin	3.20 Å
11. Receptor $\alpha_{2B}$	Homologia	Prazosin	-
12. Receptor 5-HT <sub>1B</sub>	4IAQ	Dihidroergotamina	2.80 Å
13. Receptor 5-HT <sub>1A</sub>	7E2X	Buspirona	3.0
14. Receptor 5-HT <sub>2A</sub>	6A93	Risperidona	3.00 Å
15. Receptor 5-HT <sub>2C</sub>	6BQH	Ritanserina	2.70 Å

Fonte: dados da Pesquisa (2021).

#### 4.1.5 Predições farmacocinéticas

As predições farmacocinéticas (disponíveis gratuitamente) foram obtidas nas plataformas eletrônicas: SwissADME e pkCSM (Daina; Michielin; Zoete, 2017a; Pires; Blundell; Ascher, 2015a). Para a interface dos modelos preditivos, foi necessário que as estruturas estivessem no formato smiles, sendo geradas pelo software Chemdraw Ultra 12.0 ou pela própria plataforma.

#### 4.1.6 Investigação do mecanismo farmacológico *in vivo*

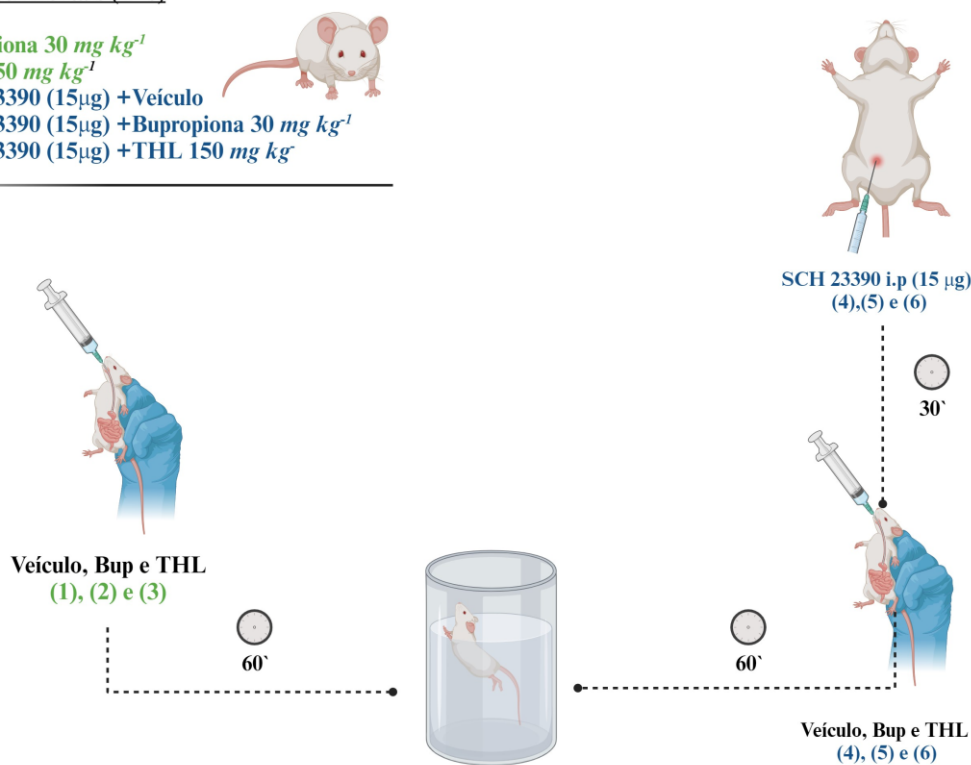
A partir do estudo de docking molecular foram obtidos resultados de energias favoráveis do acoplamento do THL com as seguintes proteínas: receptor D<sub>1</sub>, NMDA, nNOs, e GCs, sendo a dopaminérgica, glutamatérgica e oxidonitrérgica escolhidas para investigação do mecanismo de ação no modelo animal de nado forçado.

#### 4.1.6.1 *Envolvimento do receptor dopaminérgico D<sub>1</sub>*

Camundongos foram separados em grupos distintos (n=6) e pré-tratados isoladamente com (1) veículo (NaCl a 0,9% em água destilada + Tween 80 a 0,5%, v.o.), (2) bupropiona (30 mg kg<sup>-1</sup>, v.o) ou (3) THL (150 mg kg<sup>-1</sup>, v.o) ou associados com SCH23390 (15 µg/kg, i.p.) – um antagonista enantioesletivo dos receptores D<sub>1</sub>-símile (Bourne, 2001). Após um período de 60 minutos, os animais submetidos ao modelo do nado forçado, no qual o tempo de imobilidade foi determinado ao longo de um período de 5 minutos (Figura 9) (Gu *et al.*, 2020; Sartori *et al.*, 2020).

##### **Grupos experimentais (n=6)**

- (1) Veículo
- (2) Bupropiona 30 mg kg<sup>-1</sup>
- (2) THL 150 mg kg<sup>-1</sup>
- (4) SCH 23390 (15µg) +Veículo
- (5) SCH 23390 (15µg) +Bupropiona 30 mg kg<sup>-1</sup>
- (6) SCH 23390 (15µg) +THL 150 mg kg<sup>-1</sup>



**Figura 9.** Protocolo experimental para investigação do envolvimento do receptor D<sub>1</sub> no efeito antidepressivo-símile do THL. Criado pelo Biorrender (2023).

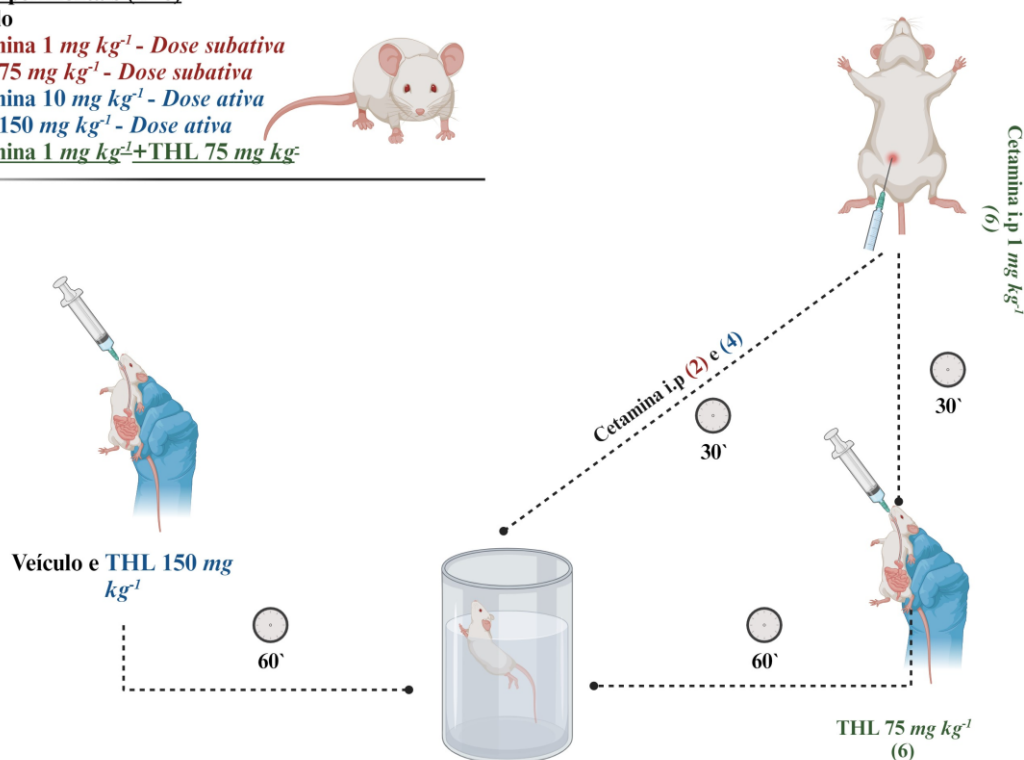
#### 4.1.6.2 *Envolvimento do receptor NMDA*

Para compreender a possível participação da via glutamatérgica na ação do monoterpeno no modelo do nado forçado, foi realizado um estudo de potencialização. Sendo assim, os animais foram divididos em grupos (n=6) que receberam os seguintes tratamentos: (1) veículo (NaCl a 0,9% em água destilada + Tween 80 a 0,5%, v.o.), (2) a dose subativa do THL (75 mg

$kg^{-1}$ v.o), (3) a dose subativa da cetamina ( $1\text{ mg kg}^{-1}$  i.p), (4) a dose ativa do THL ( $150\text{ mg kg}^{-1}$ v.o), (5) a dose ativa da cetamina ( $10\text{ mg kg}^{-1}$  i.p) ou grupo (6) associação entre as doses subativas - cetamina ( $1\text{ mg kg}^{-1}$ , i.p, após 30 minutos o THL ( $75\text{ mg kg}^{-1}$  v.o). Para os grupos tratados com o veículo e o THL pela via oral, a avaliação comportamental se deu após 60 minutos, já para a administração da cetamina, intraperitoneal a avaliação foi após 30 minutos. O tempo de imobilidade foi cronometrado por um período de 5 minutos (Figura 10) (Fitzgerald; Yen; Watson, 2019; Rafalo-Ulinska; Brainski; Palucha-Poniewiera, 2022).

**Grupos experimentais (n=6)**

- (1) Veículo
- (2) Cetamina  $1\text{ mg kg}^{-1}$  - Dose subativa
- (3) THL  $75\text{ mg kg}^{-1}$  - Dose subativa
- (4) Cetamina  $10\text{ mg kg}^{-1}$  - Dose ativa
- (5) THL  $150\text{ mg kg}^{-1}$  - Dose ativa
- (6) Cetamina  $1\text{ mg kg}^{-1}$ +THL  $75\text{ mg kg}^{-1}$

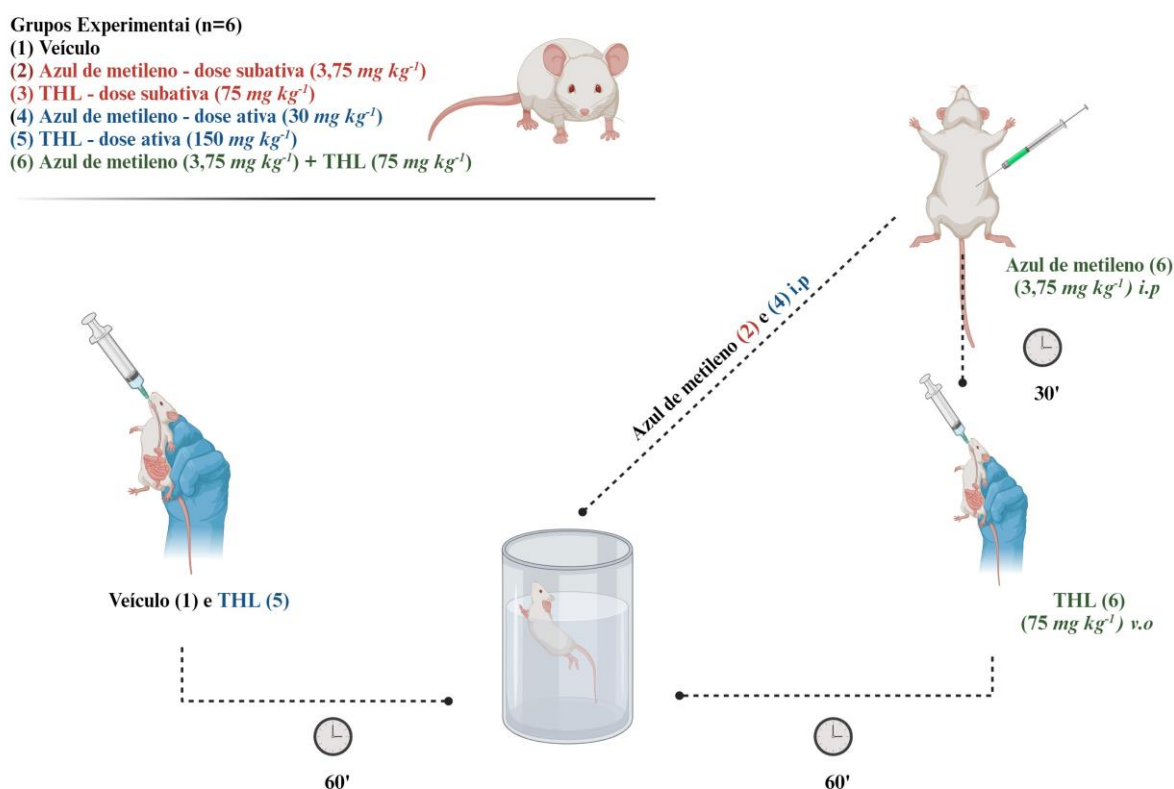


**Figura 10.** Protocolo experimental para investigação do envolvimento do receptor NMDA no efeito antidepressivo-símile do THL. Criado pelo Biorrender (2023).

**4.1.6.3 Envolvimento da via oxidonitrérgica**

O envolvimento da via oxidonitrérgica na atividade antidepressiva símile do THL foi avaliado no modelo de nado forçado. Os animais foram divididos em grupos (n=6) que receberam os seguintes tratamentos: (1) controle, tratado com o veículo (NaCl a 0,9% em água destilada + Tween 80 a 0,5%, v.o.), (2) azul de metileno ( $3,75\text{ mg kg}^{-1}$ , i.p.) (3) e THL ( $75\text{ mg kg}^{-1}$ , v.o.) doses subativas, desprovidas de efeito antidepressivo-símile, (5) azul de metileno (30

$mg\ kg^{-1}$ , i.p.) e (6) THL ( $150\ mg\ kg^{-1}$ , v.o.) doses ativas com potencial antidepressivo-símile e por fim, o grupo (6) cujos animais foram pré-tratados com as doses inativas do azul de metileno (i.p) e após 30 min com THL, visto determinar uma possível potencialização da resposta. A observação dos animais foi realizada após 30 minutos, nas administrações i.p e após 60 minutos v.o. O parâmetro analisado foi o tempo de imobilidade durante o período de 5 minutos (Benazu *et al.*, 2019) (Figura 11).

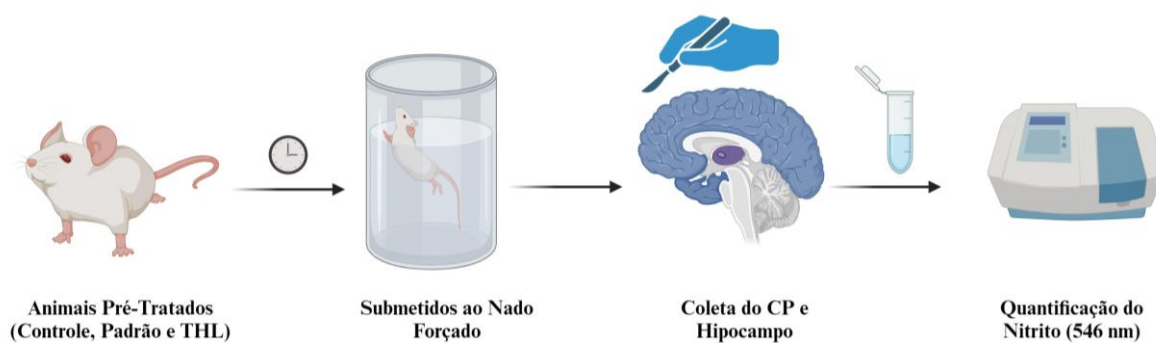


**Figura 11.** Protocolo experimental para investigação da via oxidonitrérgica (GCs/nNO) no efeito antidepressivo-símile do THL. Criado pelo Biorrender (2023).

#### 4.1.6.4 Determinação da concentração de nitrito

Os animais foram divididos em grupos (n=6) que receberam os seguintes tratamentos: (1) controle, tratado com o veículo (NaCl a 0,9% em água destilada + Tween 80 a 0,5%, v.o.), (2) THL ( $150\ mg\ kg^{-1}$ , v.o.), (3) azul de metileno ( $30\ mg\ kg^{-1}$ , i.p.) e (4) *naive* (sem tratamento e sem indução). Com exceção do grupo *naive*, decorridos 30 min do tratamento i.p. e 60 min do tratamento v.o., os animais foram submetidos ao modelo de nado forçado. Após o modelo, foi realizada a eutanásia e os encéfalos retirados foram dissecados rapidamente sob gelo para

retirada do córtex pré-frontal e hipocampo. Após coleta, as amostras foram trituradas e centrifugadas à 10.000 rpm por 10 min, e o sobrenadante do homogenato foi coletado para a quantificação de nitrito com base na reação de Griess (ácido sulfanílico diluído em água deionizada) (Green *et al.*, 1982) (Figura 12). Resumidamente, 100 mL de sobrenadante foi incubado com de 100 mL do reagente de Griess à temperatura ambiente por 10 min. A absorbância foi medida a 546 nm através de um leitor de microplacas.



**Figura 12.** Procedimento experimental para obtenção de amostras de córtex pré-frontal e hipocampo para dosagem de nitrito. Fonte: autoria/Biorrender (2023).

#### 4.2 Análise estatística

Os resultados obtidos nos experimentos *in vivo* foram analisados por análise de variância (ANOVA unidirecional), seguido do teste de Tukey para comparação de médias. Para os dados da toxicidade aguda, foi empregado o teste T. Os dados foram expressos como média  $\pm$  E.P.M. (erro padrão da média) e adotado nível de confiança de 5% ( $p < 0,05$ ).

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Estimativa da DL<sub>50</sub> e *screening* farmacológico comportamental

Para estimar a DL<sub>50</sub> do composto THL foi realizado o teste de toxicidade oral aguda segundo o protocolo 423 da OEDC (2001). Esse ensaio tem como intuito avaliar segurança de uso de compostos naturais e sintéticos subsidiando os riscos à saúde após sua exposição (Erhirhie; Ihekwereme; Ilodigwe, 2018). Os resultados demonstram que nas condições avaliadas não foram identificadas mortes ou alterações morfológicas, fisiológicas e/ou comportamentais durante o período de observação nos animais tratados com a dose de 300 e 2000 mg kg<sup>-1</sup>. Entretanto, foi detectado um volume aumentado do baço, no grupo tratado com a dose de 300 mg kg<sup>-1</sup> quando comparado ao grupo controle, porém sem indícios de alterações macroscópicas e histológicas.

**Tabela 2.** Peso relativo dos órgãos e peso final de camundongos fêmeas tratadas com o THL, na dose de 300 e 2000 mg kg<sup>-1</sup> via oral, após 14 dias.

Órgãos	Controle	THL 300 mg kg <sup>-1</sup>	THL 2000 mg kg <sup>-1</sup>
Rins	1,276 ± 0,1021	1,275 ± 0,04593	1,260 ± 0,01775
Fígado	6,280 ± 0,6231	5,618 ± 0,1522	5,678 ± 0,2600
Baço	0,5299 ± 0,008818	0,7818 ± 0,05792*	0,5269 ± 0,0224
Coração	0,5335 ± 0,06371	0,5483 ± 0,01320	0,4804 ± 0,03371
Pulmão	1,182 ± 0,2390	1,209 ± 0,09431	1,457 ± 0,3328
Cérebro	1,263 ± 0,07165	1,357 ± 0,01404	1,441 ± 0,02937
Varição de peso (g)	1,000 ± 0,5774	1,000 ± 0,5774	0,3333 ± 0,3333

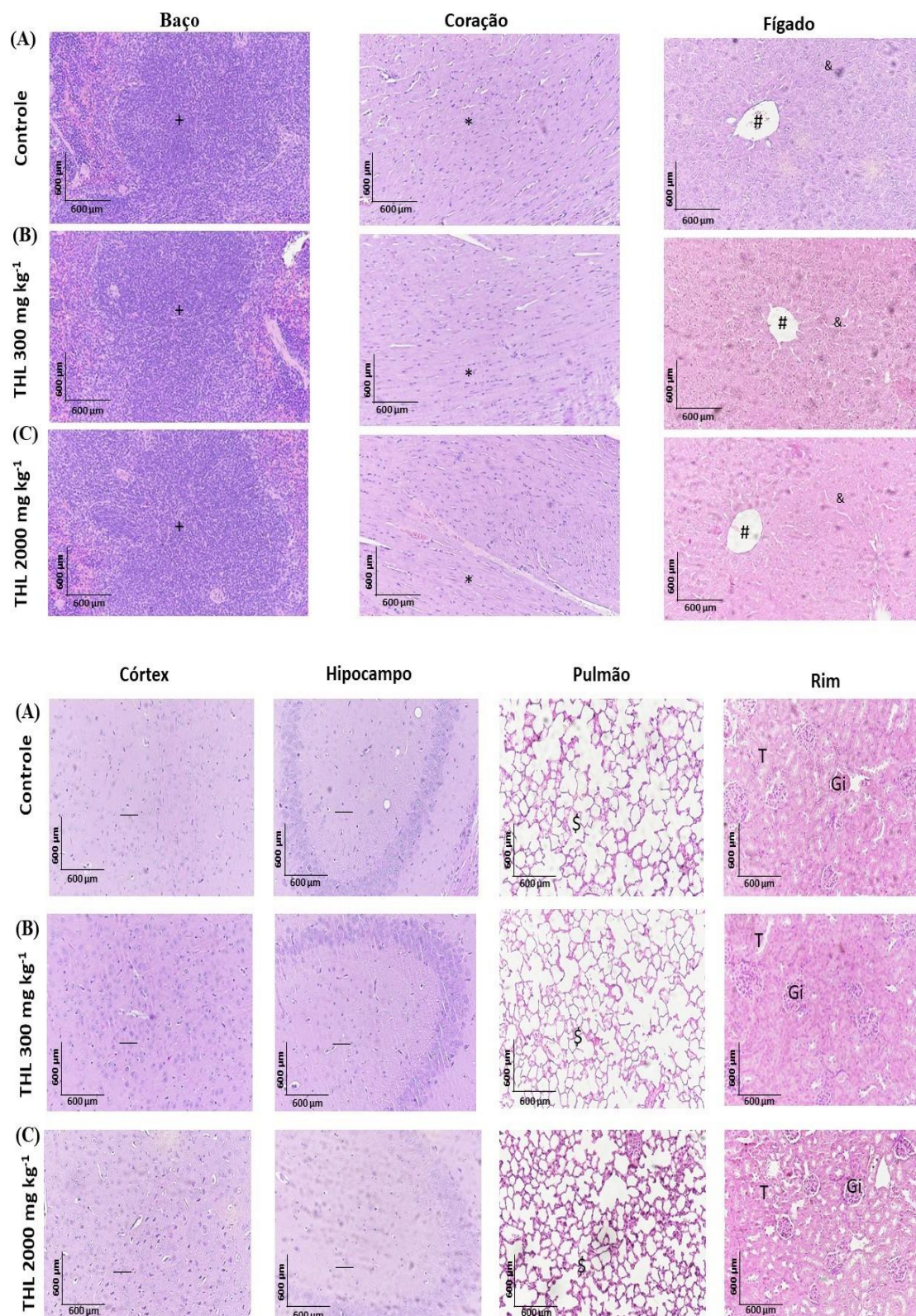
**Legenda:** Os dados são expressos como média ± EPM (n =3) determinações por grupo. \*Significativamente diferente do grupo controle tratados com salina + Tween 80, 0,5% (p <0,05).

A administração oral do THL mostrou-se destituída de toxicidade, sem indícios de alterações de funções orgânicas, olhos, pelos, pele, enquadrando-se a priori na classe 5, estimando-se que a DL<sub>50</sub> se encontra em valores compreendidos entre 2000 e 5000 mg kg<sup>-1</sup>. Com isso, foi possível sugerir a margem de segurança para a escolha das doses dos ensaios farmacológicos *in vivo* subsequentes (De Almeida *et al.*, 2012; Lapczynski *et al.*, 2008)

## 5.2 Análise histológica da toxicidade aguda

Nas condições experimentais adotadas não foram observadas alterações histológicas nos órgãos dos animais submetidos aos tratamentos com THL nas doses de 300 e 2000  $mg\ kg^{-1}$ , em comparação ao grupo veículo (Figura 13). No baço, a análise revelou a presença de polpa branca e vermelha esplênica em estado normal, sem sinal de ativação linfática (+). O exame do tecido cardíaco revelou distensão dos cardiomiócitos com manutenção do padrão de corte (feixes musculares unidirecionais e uniformemente distribuídos) (\*). Na análise do fígado, observou-se hepatócitos organizados em cordões com tamanho e formato inalterados (&), indo em direção à veia central do lobo hepático (#). No que diz respeito às análises histológicas do sistema nervoso central, observou-se a preservação do parênquima neuronal em termos de tamanho, forma e distribuição, tanto no córtex quanto no hipocampo (-). No tecido pulmonar a estrutura respiratória e os alvéolos não apresentaram alterações (limpos e acelulares), com ramos aéreos vasculares (\$). Por fim, na análise do rim, tanto o glomérulo (Gi) quanto os túbulos (T) mantiveram sua morfologia normal (Lira *et al.*, 2022).

A análise histológica é um componente vital nos protocolos de toxicidade aguda, desempenhando um papel central na avaliação dos efeitos tóxicos em nível celular e tecidual. Por meio dessa análise é possível identificar alterações microscópicas nos órgãos e tecidos, fornecendo informações valiosas sobre a natureza e a gravidade dos danos causados por substâncias químicas. Como não foram observadas alterações histológicas, podemos inferir segurança do uso do THL, reforçando seu potencial como candidato à fármaco de origem vegetal com perfil adequado de segurança (Rocha-Pereira *et al.*, 2019).



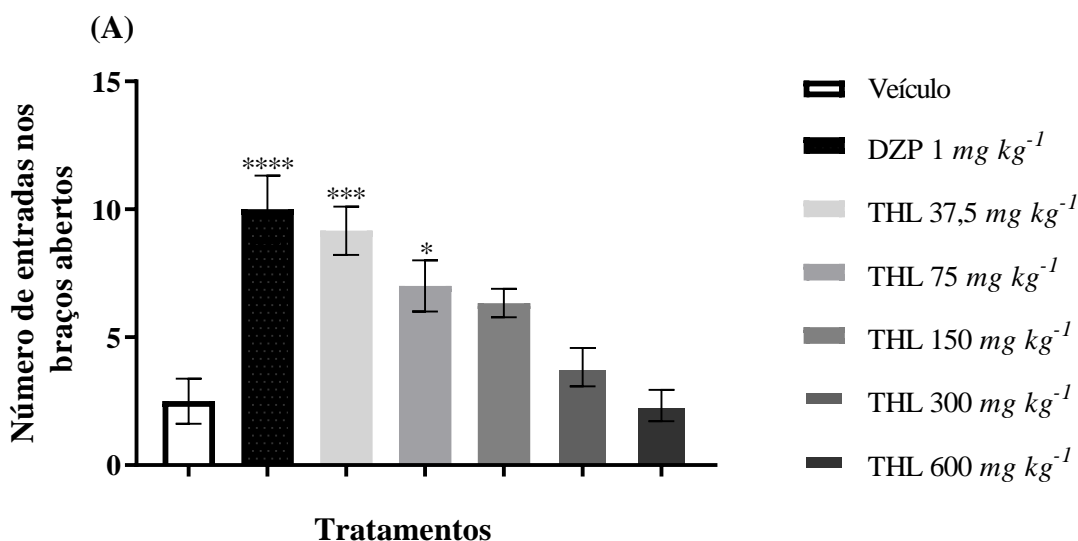
**Figura 13.** Cortes histológicos corados em HE nos órgãos (baço, coração, fígado, córtex, hipocampo, pulmão e rins) em animais tratados com o veículo (tween 80 0,5%) (A), THL (300 mg kg<sup>-1</sup>) (B) e THL (2000 mg kg<sup>-1</sup>) (C) submetidos à análise de toxicidade aguda.

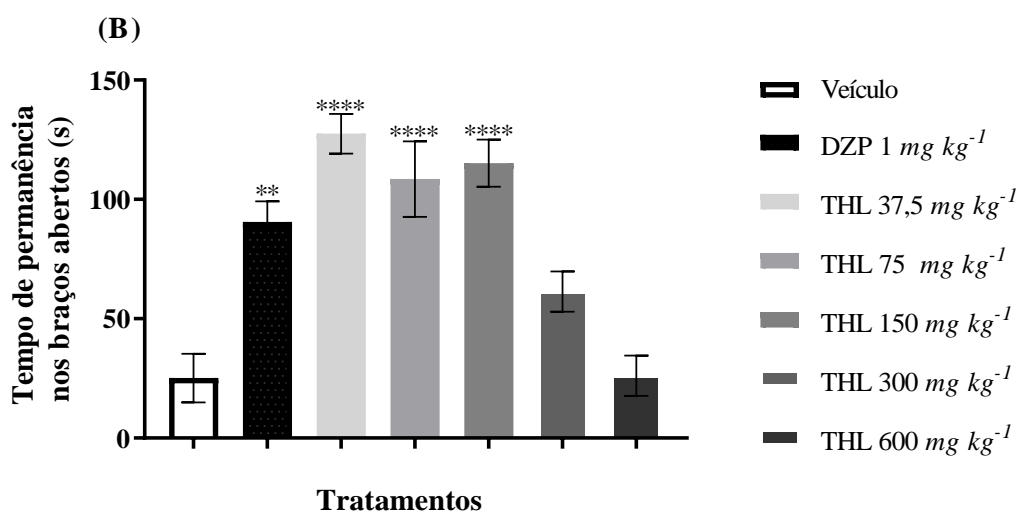
### 5.3 Avaliação do potencial ansiolítico símile do THL

#### 5.3.1 Teste do Labirinto em Cruz Elevado (LCE)

Para investigação do potencial ansiolítico símile do THL os animais foram submetidos ao modelo do Labirinto em Cruz Elevado (LCE), que tem como intuito mimetizar a aversão natural que os roedores apresentam frente a ambientes desconhecidos, abertos e elevados, cujo perigo iminente, implicam em estados inibitórios, diminuindo a capacidade exploratória do animal, caracterizado pela redução da visitação e/ou tempo de permanência nos braços abertos do aparelho (Campos *et al.*, 2013). Os resultados apresentados na Figura 14A demonstram que os animais tratados com o DZP  $1 \text{ mg kg}^{-1}$  apresentou um aumento significativo no número de entradas nos braços abertos do labirinto (NEBA) em 75% em relação ao grupo tratado com veículo ( $2,5 \pm 0,9$ ). De forma semelhante, o THL nas doses de  $37,5$  e  $75 \text{ mg kg}^{-1}$  aumentou significativamente o NEBA em 72,7 ( $9,2 \pm 0,9$ ) e 64,3% ( $7,0 \pm 1,0$ ) respectivamente, em relação ao grupo tratado com veículo. O mesmo efeito, entretanto, não foi observado com as outras doses do composto.

Com relação ao tempo de permanência nos braços abertos (TPBA) (Figura 14B), o tratamento com o DZP  $1 \text{ mg kg}^{-1}$ , aumentou significativamente o TPBA ( $90 \pm 8,7\text{s}$ ) em 72,2% em relação ao grupo veículo. De forma semelhante, o tratamento com o THL ( $37,5$ ,  $75$  e  $150 \text{ mg kg}^{-1}$ ) aumentou significativamente o TPBA, respectivamente, em  $80,3$  ( $127,5 \pm 8,4 \text{ s}$ ),  $76,8$  ( $108 \pm 15,9 \text{ s}$ ) e  $78,2\%$  ( $115,2 \pm 9,9 \text{ s}$ ) em relação ao grupo veículo. O mesmo efeito não foi observado com as demais doses do THL.





**Figura 14.** Efeito do THC nas doses (37,5 – 600 mg kg<sup>-1</sup>v.o) e DZP (1 mg kg<sup>-1</sup>i.p), no número de entradas (A) e tempo de permanência (B) dos animais nos braços abertos do labirinto em cruz elevado. A coluna representa a média ± EPM (n = 6). Análise estatística: ANOVA unidirecional seguida do teste de Tukey, \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*\*p<0,001: (THL) = vs. controle e (DZP) = vs. controle.

Com isso, verificamos que os resultados sugerem que o THL nas doses de 37,5, 75 e 150 mg kg<sup>-1</sup> é dotado de potencial farmacológico ansiolítico-símile, uma vez que apresentou aumento estatisticamente significativo nos parâmetros do LCE (NEBA e TPBA). Em razão da inexistência de estudos psicofarmacológicos utilizando o THL, foi tomado como base pesquisas científicas envolvendo o seu precursor, o linalol ou derivados da rota sintética. Estudos tem demonstrado que o tratamento com as formas enantioméricas do linalol (*R*) e (*S*) na dose de 500 mg kg<sup>-1</sup> demonstra apresentar potencial ansiolítico símile por aumentar significativamente a duração de permanência dos animais nos braços abertos do LCE em comparação com grupo controle, sem diferença significativa em comparação ao grupo tratado com a droga empregada como padrão, a trazodona na dose de 75 mg kg<sup>-1</sup> (Cheng; Sheen; Chang, 2015).

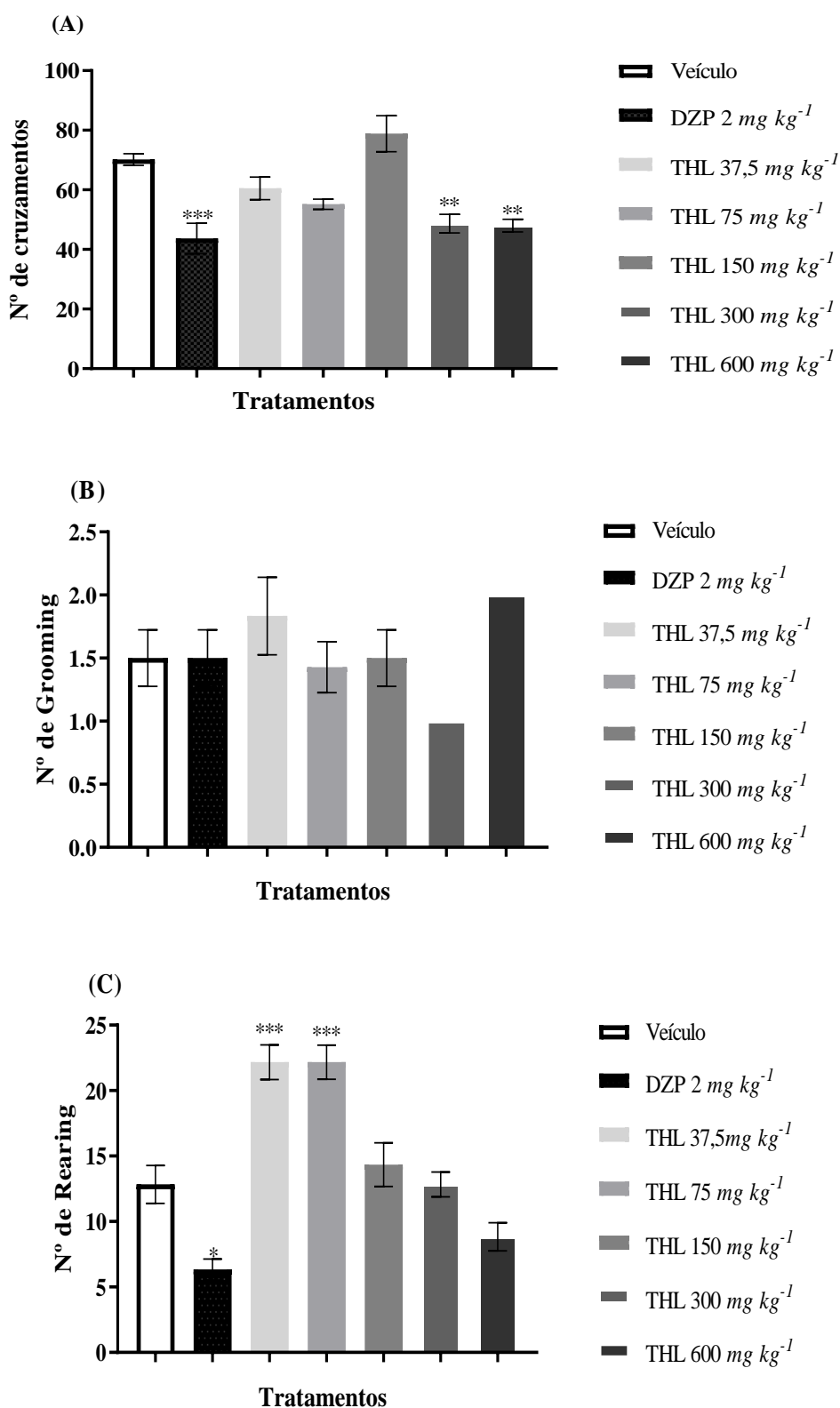
É importante ressaltar que o modelo do LCE é considerado padrão ouro na investigação de drogas com perfil benzodiazepínico. Quando há um aumento nesses parâmetros, a droga parece possuir efeito ansiolítico-símile, uma vez que o comportamento natural dos roedores é permanecer mais tempo em ambientes fechados e escuros por considera-los mais seguros (Cruz; Landeira-Fernandez, 2017). Também é válido destacar que fármacos dotados de efeito ansiolítico-símile do tipo benzodiazepínico, em sua maioria, apresentam como efeitos colaterais como sedação, promovendo alterações na coordenação motora, que podem influenciar na não adesão

à terapia. Assim, para avaliar a possibilidade do THL apresentar esses efeitos, foram realizados o teste de campo aberto e rota rod, que serão apresentados posteriormente.

### 5.3.2 Teste do Campo aberto

O teste do campo aberto, possibilita discutir a especificidade do efeito de uma droga, caso ela seja estimulante, sedativa, ansiolítica ou ansiogênica (Lister, 1987). O aumento da atividade locomotora pode ser considerado um efeito estimulante, enquanto a diminuição da atividade vertical (NR) e horizontal (NC) são relacionadas à sedação (Prut et al., 2003). Dessa forma, o aumento ou a diminuição da atividade motora espontânea fornece uma indicação do nível de excitabilidade do sistema nervoso central (Mansur *et al.*, 1971). De acordo com a Figura 15A, o tratamento com o DZP 2  $mg\ kg^{-1}$  diminuiu significativamente o número de cruzamentos (NC) dos animais em 37,8% ( $43,7 \pm 5,1$ ) em relação ao grupo veículo ( $70,2 \pm 1,9$ ). De forma semelhante, o tratamento com o THL 300 e 600  $mg\ kg^{-1}$  diminuiu significativamente o NC em 30,6 ( $48,7 \pm 3,1$ ) e 31,6% ( $48 \pm 2,1$ ), respectivamente, em relação ao grupo veículo. Os grupos tratados com o monoterpene, nas doses de 37,5 ( $60,5 \pm 3,8$ ), 75 ( $55,2 \pm 1,7$ ) e 150 ( $78,8 \pm 6,0$ ), não apresentou diferença significativa no NC quando comparados ao grupo controle.

Em relação ao número de *grooming* (autolimpeza), a figura 15B, demonstra que o tratamento com o DZP 2  $mg\ kg^{-1}$  ( $1,5 \pm 0,22$ ) não alterou significativamente o NG em relação ao grupo tratado com o veículo ( $1,5 \pm 0,22$ ). De forma semelhante, o tratamento com o THL (37,5 – 600  $mg\ kg^{-1}$ ), não apresentou diferença significativa ( $1,83 \pm 0,31$ ) em relação ao grupo controle. Por fim, em relação ao número de *rearing* (NR) (exploração vertical), Figura 15C, mostra que, o tratamento com o DZP 2  $mg\ kg^{-1}$  apresentou redução no número de *rearing* em 50,7 % ( $6,3 \pm 0,8$ ), quando comparado ao grupo controle ( $12,8 \pm 1,4$ ). Para os grupos tratados com THL nas doses de 37,5 ( $22,2 \pm 1,3$ ) e 75 ( $22,2 \pm 1,3$ )  $mg\ kg^{-1}$  houve um aumento significativo no NR em 42%, quando comparadas ao grupo controle ( $12,8 \pm 1,4$ ). As demais doses do THL não apresentaram diferenças significativas em relação a estes parâmetros, quando comparadas ao grupo controle (veículo).



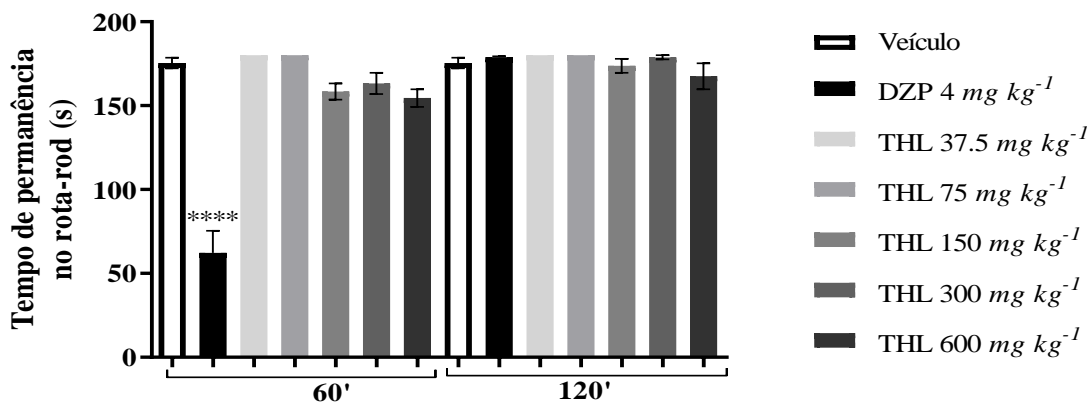
**Figura 15.** Efeito do THC nas doses (37.5 – 600 mg kg<sup>-1</sup>v.o) e DZP (2 mg kg<sup>-1</sup>i.p), no número de cruzamentos (A), número de grooming (B), e rearing (C) dos animais no campo aberto. A coluna representa a média ± EPM. (n = 6). Análise estatística: ANOVA unidirecional seguida

do teste de Tukey, \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\*\* $p < 0,001$ : (THL) = vs. controle e (DZP) = vs. controle.

No campo aberto, foi possível visualizar uma redução estatisticamente significativa da atividade locomotora dos animais tratados com o THL nas doses de 300 e 600  $mg\ kg^{-1}$ , frente ao parâmetro do NC, sugerindo que para o tratamento com essas doses, pode haver um efeito sedativo por um mecanismo GABAérgico, característico de drogas depressoras centrais padrão benzodiazepínicas. Nesse modelo, é possível avaliar o efeito estimulante ou depressor central de uma substância baseado em sua atividade locomotora, considerando que os roedores tendem a explorar um ambiente ao qual são expostos (Costa *et al.*, 2012; García-Rios *et al.*, 2019). Com relação ao comportamento de *rearing* se pode observar frequentemente em roedores, que ficam em pé com as patas traseiras. Esse comportamento natural é característico de uma atividade exploratória, preditiva da atividade ansiolítica-símile. O THL por sua vez, nas doses de 37,5 e 75  $mg\ kg^{-1}$  aumentou o número de *rearing*, no entanto, sem promover efeitos sedativos.

### 5.3.3 Rota Rod

Em seguida, para examinar se os tratamentos com o THL causam prejuízos a função motora dos animais, foi realizado o teste de *rota rod* cujo parâmetro observado foi o número de quedas e o tempo de permanência na barra giratória. Como resultado, demonstrado pela Figura 16, os animais tratados com o padrão DZP (4  $mg\ kg^{-1}$ ), apresentaram uma redução significativa 66% ( $62,2 \pm 13,2\ s$ ) do TP em relação ao grupo que recebeu o veículo ( $180 \pm 0\ s$ ). Como resultado (Figura 16), após 60 minutos, os animais que receberam o padrão DZP (4  $mg\ kg^{-1}$ ) apresentaram uma redução significativa de 64,54 % ( $62,2 \pm 13,2\ s$ ) do TP em relação ao grupo que recebeu o veículo ( $180 \pm 0\ s$ ). O tratamento com o THL (37,5 e 600  $mg\ kg^{-1}$ ) não apresentou diferença estatisticamente significativa em relação ao veículo.



**Figura 16.** Efeito do THL nas doses (37,5 - 600 mg kg<sup>-1</sup> v.o) no tempo de permanência dos animais no *rota-rod*. A coluna representa a média ± EPM. (n = 6). Análise estatística: ANOVA unidirecional seguida do teste de Tukey, \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*\*p<0,001: (THL) = vs. controle e (DZP) = vs. controle.

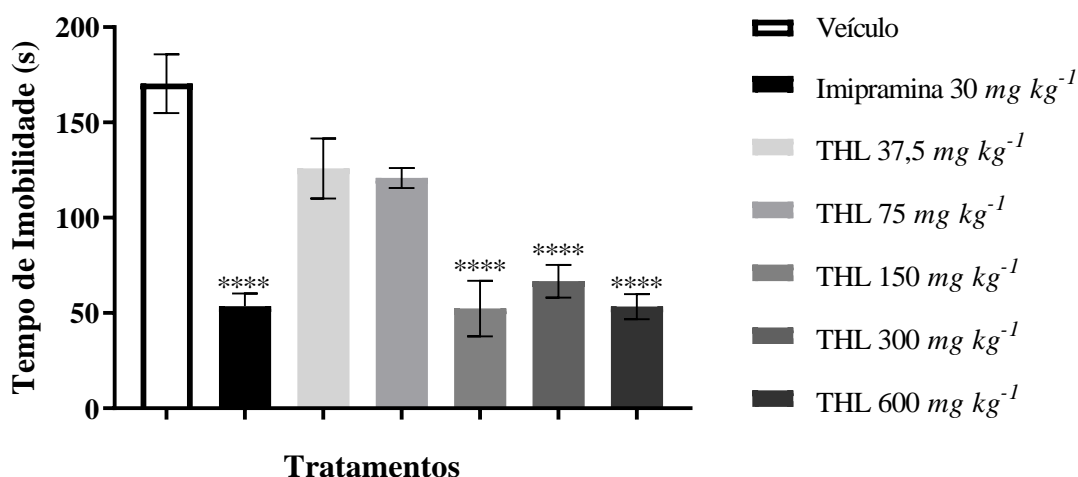
Os modelos animais utilizados para avaliar a influência de substância sob a coordenação motora do animal são de grande importância para minimizar equívocos de interpretações comportamentais. Por exemplo, se o THL apresentasse efeito estimulatório, a diminuição da imobilidade no teste de natação forçada pode ser incorretamente identificada como um efeito semelhante ao antidepressivo (Mori *et al.*, 2013; Nielsen *et al.*, 1986; Rauhut; Hawrylak; Mardekian, 2008). Estudos com o OE da espécie *Cinnamomum osmophloeum* ct. que apresenta como composto majoritário o linalol, observaram que não houve diferença significativa da latência para a queda no *rota rod* entre o grupo tratado oralmente com óleo da folha na dose de 100 mg kg<sup>-1</sup> (Oil, 2021).

Derivados do linalol - óxido de linalol - também não causaram danos a coordenação motora quando administrados intraperitonealmente nas doses de 50, 100 e 150 mg kg<sup>-1</sup> (SOUTO-MAIOR *et al.*, 2017). Os resultados da avaliação motora no *rota rod* para os animais tratados com o THL encontram-se em concordância com o linalol e derivados, sugerindo, que a dose responsável pelo efeito ansiolítico-símile não altera a coordenação motora, diferente dos benzodiazepínicos, cujo uso pode ser restringido em razão das deficiências psicomotoras que podem ser desencadeadas pelo seu uso (Lader, 1999; Prevot *et al.*, 2019).

### 5.3.2 Avaliação do potencial antidepressivo símile do THL

O modelo de nado forçado é fundamentado na hipótese de que a imersão forçada de animais em água estimula comportamentos relacionados à depressão, como a imobilidade. Reduzir o tempo de imobilidade após a administração de substâncias sugere a eficácia antidepressiva, refletindo uma maior resistência ao desespero. Esse modelo é uma ferramenta pré-clínica para avaliar o potencial de compostos antidepressivos, embora os resultados devam ser interpretados com cautela e validados por meio de outras abordagens comportamentais e bioquímicas (Can *et al.*, 2011). Como dito anteriormente, o parâmetro mensurado, é o tempo de imobilidade (TI), caracterizado pela falta de movimento pelo animal, exceto o necessário para manter suas condições respiratórias (Yuen; Swanson; Witkin, 2017). Como observado na Figura 17, o

tratamento com a imipramina  $30 \text{ mg kg}^{-1}$  reduziu significativamente o tempo de imobilidade (TI) em 69% ( $53,5 \pm 6,8$ ) em relação ao grupo veículo ( $170,3 \pm 15,4$ ). De forma semelhante, a exposição aguda ao THL nas doses de 150, 300 e  $600 \text{ mg kg}^{-1}$  reduziram significativamente o TI, respectivamente em: 69,3% ( $52,33 \pm 14,5 \text{ s}$ ), 60,9% ( $66,67 \pm 8,6 \text{ s}$ ) e 68,7% ( $53,3 \pm 6,6$ ) em relação ao grupo veículo. Para as doses de 150, 300 e  $600 \text{ mg kg}^{-1}$  não foi observada diferença estatisticamente significativa entre as três doses do THL para o parâmetro avaliado, estabelecendo a dose de  $150 \text{ mg kg}^{-1}$  para continuidade nos ensaios de investigação do mecanismo antidepressivo-símile do monoterpeno.



**Figura 17.** Efeito do THL em diferentes doses ( $37,5 - 600 \text{ mg kg}^{-1}$  v.o) e Imipramina (IP) ( $30 \text{ mg kg}^{-1}$  i.p), no tempo de imobilidade (s) no teste de natação forçada. A coluna representa a média  $\pm$  EPM. (n = 6). Análise estatística: ANOVA unidirecional seguida do teste de Tukey, \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\*\* $p < 0,001$ : (THL) = vs. controle e (DZP) = vs. controle.

Plantas aromáticas, produtoras de OE ricas em linalol na região amazônica são extensivamente utilizadas na medicina tradicional em razão das suas propriedades antidepressivas. Dentre as espécies citadas, tem-se: *Aniba rosaeodora* Ducke (pau-rosa, pau-rosa), *Aniba parviflora* (Meissn.) Mez (macacaporanga) e *Aeollanthus suaveolens* Mart. ex Spreng (catinga-de-mulata) (DOS SANTOS et al., 2018). Estudos com esses OE e com o padrão linalol ( $30 \text{ mg kg}^{-1}$ ) demonstraram efeitos significativos nos modelos de natação forçada, nas maiores doses ( $35, 85$  e  $75 \text{ mg kg}^{-1}$ ), diminuindo significativamente o tempo de imobilidade dos animais quando comparados ao controle. O linalol também apresenta efeito em modelos que tentam simular a anedonia, como o *splash test* que avalia o comportamento de autolimpeza (Dos Santos et al.,

2018; Kalueff; Tuohimaa, 2004). A anedonia é caracterizada pela perda do interesse no desenvolvimento de atividades diárias, sendo considerado um sintoma central no diagnóstico de transtornos depressivos (Mcmakin *et al.*, 2012; Rizvi *et al.*, 2016; Uher *et al.*, 2012).

O linalol e acetato de linalila são compostos majoritários em uma série de OE como o de lavanda *Lavandula angustifolia* Mill, utilizado na terapêutica no controle de transtornos depressivos maiores e ansiedade, sendo esse OE comercialmente disponível em cápsulas, com nome comercial Silexan® (Müller *et al.*, 2021). Esse medicamento apresenta-se nas doses de 80 e 160 mg, sendo indicado em quadros de comorbidade de TAG e TDM (CID-10 F41.2) (KASPER *et al.*, 2010). Os possíveis mecanismos de ação envolvem a modulação dos canais de cálcio dependentes de voltagem, que influenciam na neuroplasticidade mediada pelo CREB e ativação de cinases de sinalização intracelular como PKA e MAPK (Müller *et al.*, 2021).

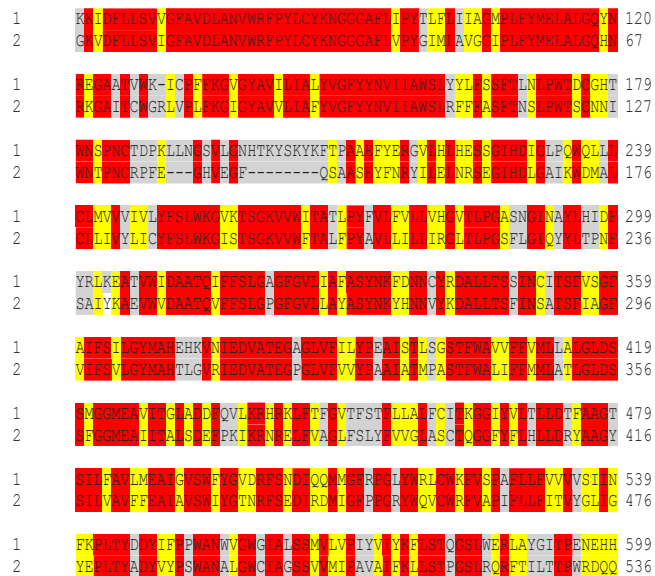
Estudos farmacológicos com o linalol demonstram que seu potencial ansiolítico-símile e antidepressivo-símile parece envolver a modulação de diversas vias de sinalização. Diante disso, foi considerada a possibilidade de avaliar o envolvimento de importantes alvos moleculares relacionados ao tratamento dos transtornos de ansiedade e depressão no efeito do THL. Para tanto, foram realizados estudos computacionais, os quais direcionaram a realização de testes *in vivo* mais específicos para a elucidação do possível mecanismo de ação do THL.

## 5.4 Testes *in silico*

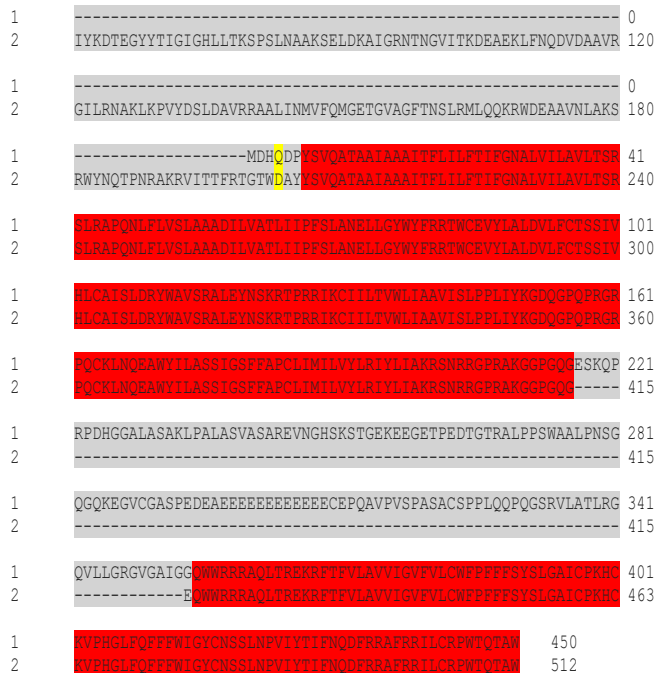
### 5.4.1 Alinhamento de sequências proteicas

O alinhamento de sequências de proteínas é uma ferramenta que ajuda a verificar a semelhança e identidade da mesma proteína de diferentes espécies ou diferentes proteínas da mesma espécie. Com esta técnica, é possível analisar as regiões conservadas e identificar resíduos comuns do local ativo. Além disso, é possível apontar diferenças e semelhanças estruturais que podem contribuir para o desenvolvimento de medicamentos. Assim, foi investigado os aminoácidos compartilhados entre as sequências das proteínas alvos e das proteínas moldes. Os resultados mostraram que o transportador de noradrenalina do *Homo sapiens* obteve 59,27% de identidade com a Dopamina 1 de *Drosophila melanogaster* (Figura 18). Enquanto que o receptor  $\alpha_{2B}$  do *H. sapiens* obteve 97,76% de identidade com o receptor  $\alpha_{2B}$  de *Bous taurus* (Figura 19). Os resultados de alinhamento mostraram que as sequências proteicas alvo apresentaram

um grau elevado de identidade e similaridade, o que possibilitou a construção dos modelos de homologies confiáveis dessas proteínas.



**Figura 18.** Alinhamento da sequência do alvo transportador de noradrenalina do *Homo sapiens* (1) e do molde (Dopamina 1 de *Drosophila melanogaster*) (2). As regiões cinzas correspondem a aminoácidos não semelhantes e não idênticos. As regiões vermelhas correspondem apenas a aminoácidos idênticos. As regiões amarelas são os aminoácidos semelhantes.

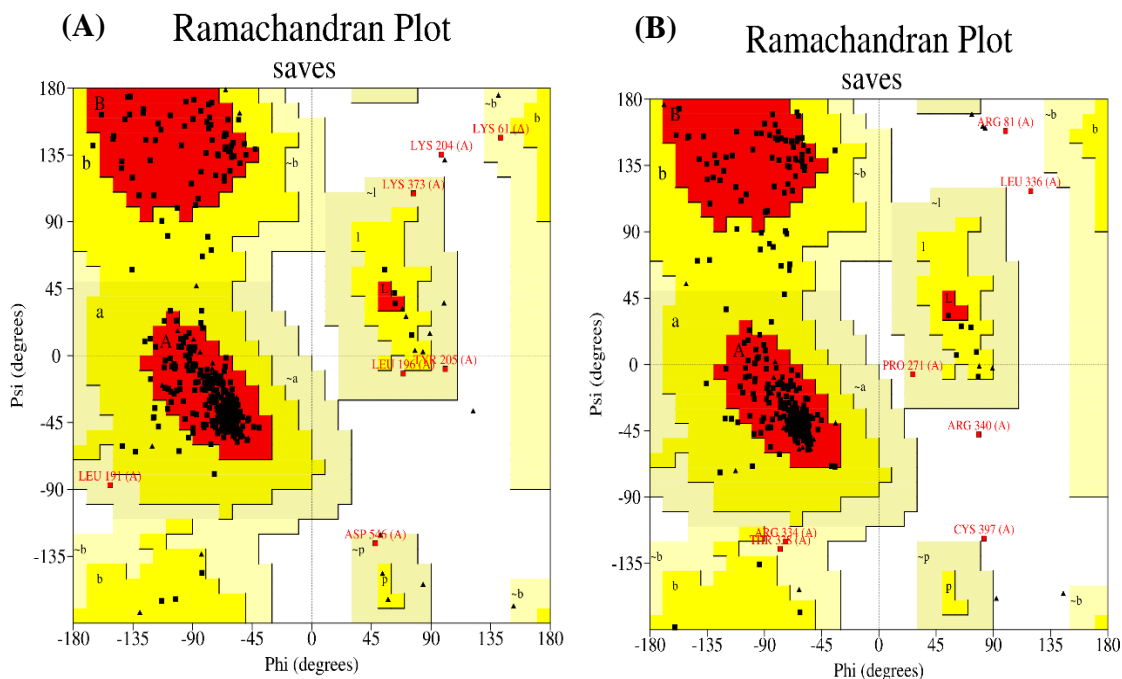


**Figura 19.** Alinhamento da sequência do alvo receptor  $\alpha_{2B}$  do *H. sapiens* (1) e do molde (receptor  $\alpha_{2B}$  de *Bous taurus*) (2). As regiões cinzas correspondem a aminoácidos não semelhantes

e não idênticos. As regiões vermelhas correspondem apenas a aminoácidos idênticos. As regiões amarelas são os aminoácidos semelhantes.

#### 5.4.2 Modelagem por homologia

O modelo do transportador de noradrenalina e o receptor  $\alpha_{2B}$  foi gerado pelo método de modelagem por homologia. A confiabilidade dos modelos foi avaliada usando o gráfico Ramachandran, que representa todas as combinações possíveis de ângulos diédricos  $\Psi$  (psi) versus  $\phi$  (phi) para cada aminoácido em uma proteína, exceto glicina, que não possui cadeias laterais, e os modelos são considerados confiáveis quando mais de 90% dos aminoácidos estão presentes nas regiões permitidas e/ou favorecidas (regiões coloridas do gráfico). As regiões em branco representam valores discrepantes, com contatos ruins. O modelo do transportador de noradrenalina gerado apresentou de 92,2% de aminoácidos nas regiões favorecidas e 6,3% nas regiões permitidas (Figura 20A). Enquanto que o modelo do receptor  $\alpha_{2B}$  apresentou de 90,3% de aminoácidos nas regiões favorecidas e 8% nas regiões permitidas (Figura 20B). Assim, diante dos resultados, verificamos que os modelos de homologia foram considerados confiáveis.



**Figura 20.** Gráfico de Ramachandran do modelo de homologia gerado para transportador de noradrenalina (A) e receptor  $\alpha_{2B}$  (B). As regiões coloridas representam as regiões permitidas e favorecidas das estruturas secundárias e as regiões brancas representam as regiões proibidas.

### 5.4.3 Docking molecular

O composto tetrahidrolinalol (THL) foi submetido ao rastreo por meio de docking molecular em 13 proteínas. Os resultados de docking foram gerados usando duas funções de pontuação, o Moldockscore e o Rerankscore. Valores mais negativos indicaram melhores previsões para a maioria das funções de pontuação. A proteína em que o composto obteve valores de energia de ligação superior ou próximo ao fármaco padrão em pelo menos uma função de pontuação foi considerada ativa. Os resultados de docking gerados pelas cinco funções de pontuação foram validados pelo *redocking* do ligante cristalográfico com todas as proteínas investigadas. Os desvios da raiz quadrada média (RMSDs) das poses de ajuste obtidas foram calculados em comparação com a estrutura cristalina. Os valores RMSD inferiores a 2 Å indicam um grau ideal de confiabilidade de triagem. As informações sobre as estruturas de partida e os resultados da validação de *redocking* são mostradas na Tabela 3. Durante a análise de *redocking*, a maioria dos valores RMSD estavam abaixo de 2,0 Å, ou seja, as poses geradas posicionaram o ligante corretamente no local ativo. No geral, os programas forneceram valores considerados satisfatórios para a validação do docking.

**Tabela 3.** Valores de RMSD para as proteínas selecionadas no estudo de docking.

Proteína	Ligante PDB	RMSD
1. Transportador de Serotonina	68P_701	0,46
2. Transportador de Dopamina	21B_704	0,23
3. Óxido nítrico sintase neuronal (nNOS)	8EV_803	0,54
4. Guanilato ciclase solúvel (sGC)	486_3	0,19
5. Receptor NMDA	QEL_920	0,28
6. TNF- $\alpha$	307_1	0,63
7. IL-6	TLA_300	0,08
8. Receptor de dopamina -D <sub>1</sub>	G3O_501	22,53
9. Receptor de dopamina -D <sub>2</sub>	8NU_2001	0,56
10. Receptor $\alpha_{2A}$	E39	0,19
11. Receptor 5-HT <sub>1B</sub>	2GM_2001	0,19
12. Receptor 5-HT <sub>1A</sub>	8NU	0,17
13. Receptor 5-HT <sub>2A</sub>	8NU	0,21

Fonte: dados da Pesquisa (2021).

As técnicas computacionais aplicadas ao desenvolvimento e descoberta de novos fármacos permitem o direcionamento dos estudos, otimizando tempo, trabalho e custos operacionais. Atualmente, tornou-se uma das etapas iniciais para o direcionamento dos ensaios pré-

clínicos, inclusive, direcionando na compreensão de diversos mecanismos moleculares ou fenômenos biológicos. Logo, o docking molecular é uma abordagem que permite entender o processamento do acoplamento e interações de moléculas a uma proteína em nível atômico. Os cálculos gerados permitem prever a pose, orientações e afinidade do ligante aos sítios ativos do alvo. Nossos estudos puderam caracterizar o complexo THL em alvos importantes na modulação do SNC, com impacto na fisiopatologia da ansiedade e depressão.

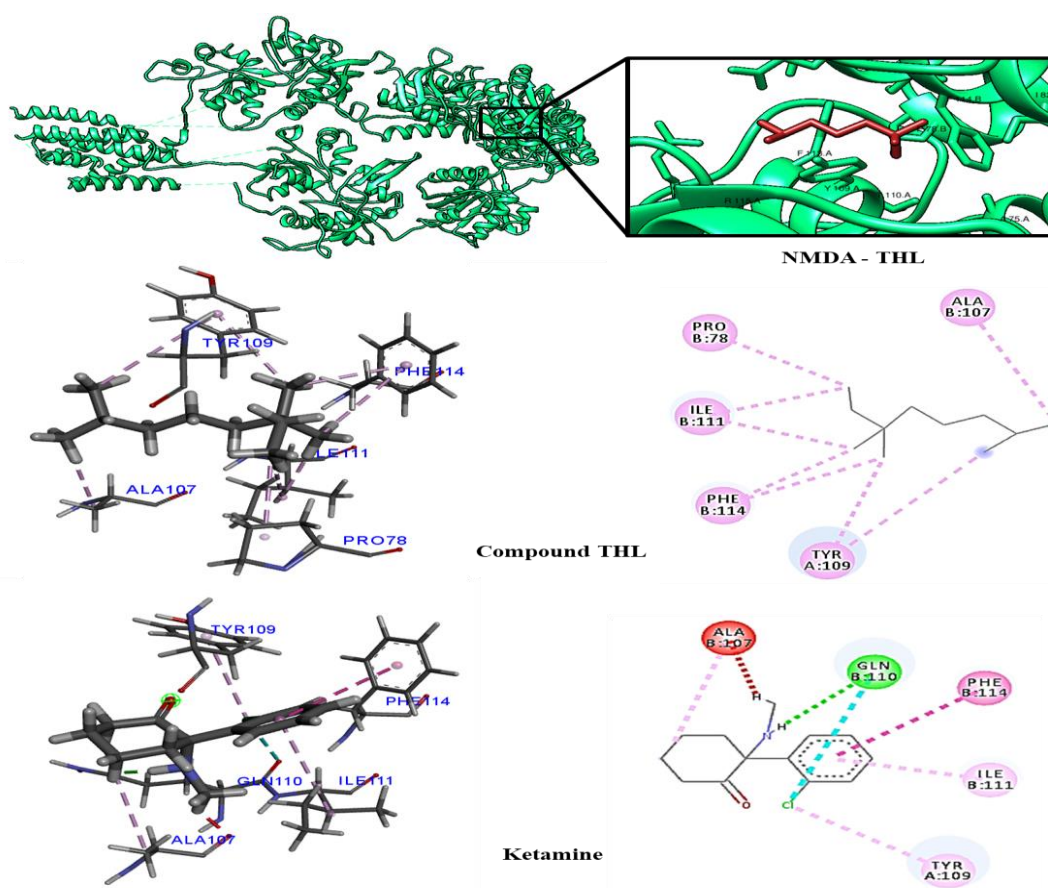
De acordo com os dados obtidos (Tabela 4) das 14 proteínas analisadas, o THL apresentou significativa interação com as proteínas nNOS, sGC, NMDA, IL-6, D<sub>1</sub>, 5-HT<sub>1A</sub>. Observamos que o composto investigado obteve valores superiores ou próximos aos valores de Rerankscore quando comparados com os controles. O THL mostrou-se mais potente no alvo das proteínas NMDA e D<sub>1</sub>, com valores de afinidade de ligação -64,67 e -44,46 Kcal/mol, respectivamente. Resultados semelhantes puderam ser observados em estudos computacionais com os fenilpropanóides 4-alil-2,6-dimetoxifenol, metileugenol e orthoeugenol, que demonstraram potencial antagonico em alvos envolvidos na depressão, como o NMDAr e nNOs (Da Silva Calixto *et al.*, 2020). Para as proteínas nNOS, sGC, IL-6, 5-HT<sub>1A</sub>, o composto tetrahidrolinalol apresentou valores de energia próximo ao do ligante cristalográfico, indicando a probabilidade de ação nessas enzimas, porém com menor interação. Esses resultados obtidos para o THL, indicam sua potencialidade através desses possíveis mecanismos de ação.

**Tabela 4.** Valores de energia de ligação analisados nas 14 proteínas selecionadas no estudo. Os melhores resultados podem estar destacados em negrito.

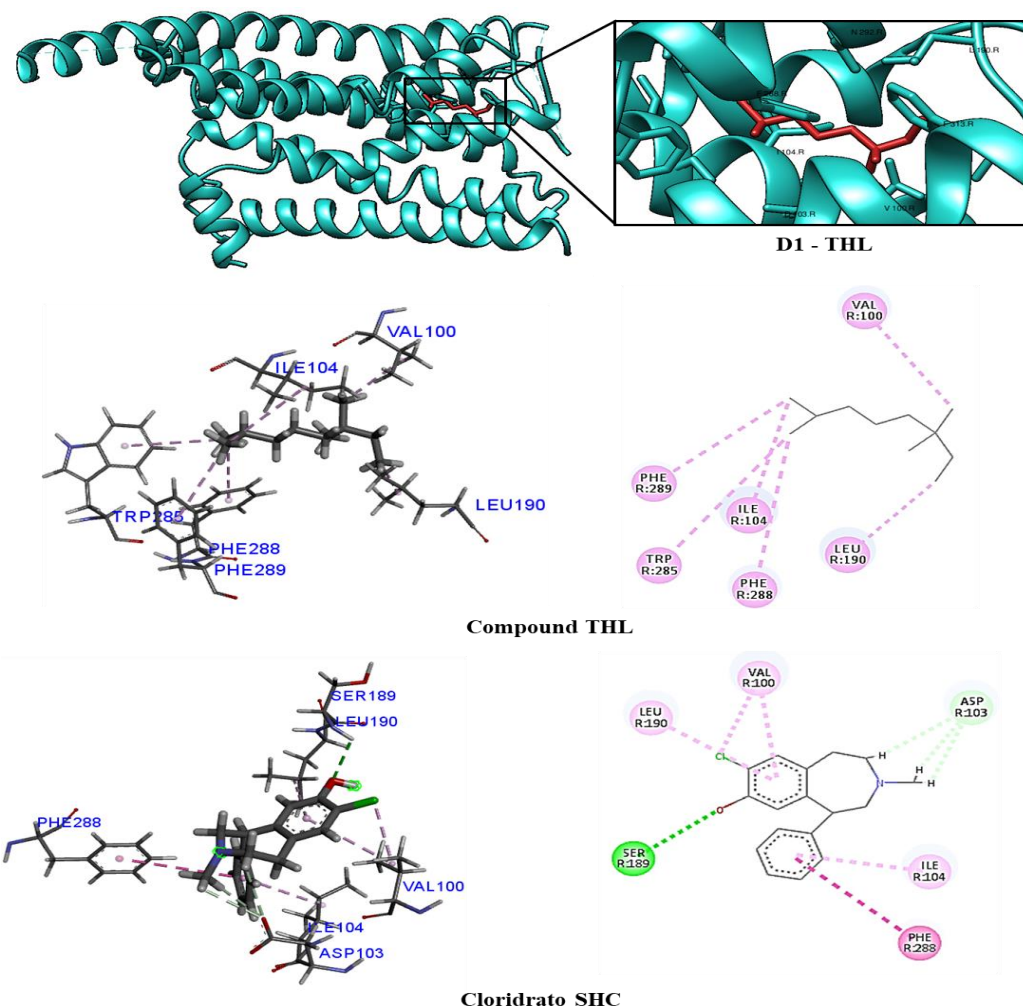
Proteína	THL		Controle positivo	
	Moldockscore	Rerankscore	Moldockscore	Rerankscore
1. Serotonina	-65.38	-55.64	-148.39	-114.03
2. Noradrenalina	-78.14	-65.02	-107.98	-85.73
<b>3. nNOS</b>	<b>-42.80</b>	<b>-35.99</b>	<b>-46.21</b>	<b>-44.33</b>
4. sGC	-61.73	-51.35	-95.24	-63.94
<b>5. NMDAr</b>	<b>-80.16</b>	<b>-64.67</b>	<b>-80.69</b>	<b>-52.32</b>
6. TNF- $\alpha$	-73.94	-59.49	-146.69	-83.99
7. IL-6	-39.99	-23.25	-86.46	-38.23
<b>8. Receptor D<sub>1</sub></b>	<b>-55.05</b>	<b>-44.46</b>	<b>-63.43</b>	<b>16.58</b>
9. Receptor D <sub>2</sub>	-83.32	-70.09	-153.86	-133.46
10. Receptor $\alpha_{2A}$	-57.29	-49.23	-129.01	-110.33
11. Receptor $\alpha_{2B}$	-53.77	-47.00	-123.18	-103.93
12. Receptor 5-HT <sub>1B</sub>	-75.28	-59.86	-216.217	-175.03
<b>13. Receptor 5-HT<sub>1A</sub></b>	<b>-72.41</b>	<b>-57.34</b>	<b>-105.95</b>	<b>-56.63</b>
14. Receptor 5-HT <sub>2A</sub>	-78.83	-66.49	-146.93	-124.58

Fonte: dados da Pesquisa (2021).

Foram observadas as interações detalhadamente formadas pelo composto THL com as proteínas em que esse composto obteve resultados de afinidade de ligação superior ao fármaco padrão. Sendo assim analisadas interações e ligações formadas com o THL e as proteínas NMDA e D1. O composto THL conseguiu formar três interações hidrofóbicas com os aminoácidos Pro78, Ala107, Tyr109, Ile111 e Phe114 com o sítio ativo da proteína NMDA (Figura 21). Enquanto que a cetamina formou uma ligação de hidrogênio com a Gln110, três interações hidrofóbicas com os aminoácidos Tyr109, Ile111 e Phe114, e uma interação desfavorável, do tipo estérica com o aminoácido Ala107. No receptor D1, o THL possui várias interações hidrofóbicas com o sítio ativo dessa proteína, dentre eles: Val110, Ile104, Leu190, Trp285, Phe288 e Phe289 (Figura 22). Já o composto padrão, o cloridrato SHC, apresentou uma ligação de hidrogênio com a Ser189, e uma ligação de van der waals com Asp103 e interações hidrofóbicas com os resíduos Val100, Ile104, Leu190 e Phe 288.



**Figura 21.** Interações 2D e 3D entre o THL, a cetamina e a proteína NMDA. As ligações de hidrogênio são destacadas em verde; as interações hidrofóbicas são destacadas em rosa e as interações estéricas são destacadas em vermelho.



**Figura 22.** Interações 2D e 3D entre o THL, a Cloridrato SHC e a proteína D<sub>1</sub>. As ligações de hidrogênio são destacadas em verde; as interações hidrofóbicas são destacadas em rosa e as interações estéricas são destacadas em vermelho.

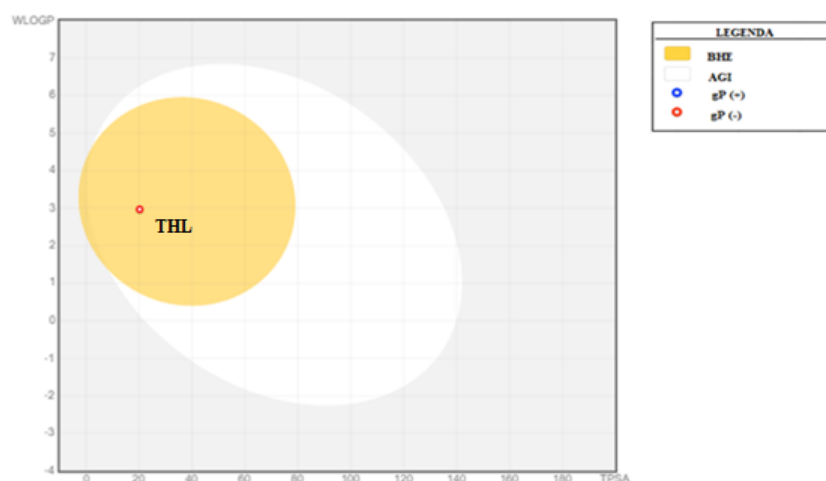
#### 5.4.4 Predições farmacocinéticas

Os mecanismos farmacocinéticos de absorção, distribuição, metabolização e excreção (ADME), vem sendo descritos como as principais causas de fracassos na descoberta de novas moléculas candidatas a medicamentos (Isyaku; Uzairu; Uba, 2020). As metodologias modernas de modelagem *in silico* que avaliam as propriedades farmacocinéticas, tornam-se interessantes durante os estudos iniciais, otimizando o processo de pesquisa de novos fármacos, identificando os principais problemas de ADME que compromete as fases posteriores das pesquisas não clínicas (Wang *et al.*, 2019). Nesse contexto, dentre as ferramentas computacionais alternativas,

tem-se o *SwissADME* e *pkCSM* que oferecem acesso a um pool de modelos preditivos e robustos para propriedades físico-químicas, farmacológicas e química medicinal (Daina; Michielin; Zoete, 2017b).

Para determinação de possíveis falhas farmacocinéticas do THL, foram realizadas predições nas plataformas anteriormente citadas. Inicialmente, foram observados os parâmetros de Lipinski, cujas regras determinam a chance do composto ser potencialmente promissor e ativo por via oral. Os critérios são: (a) peso molecular  $\leq 500$  da; (b)  $\text{LogP} \leq 5$  (ou  $\text{MLogP} \leq 4,15$ ); (c) número de aceptores de ligações de hidrogênio  $\leq 10$ ; (d) número de doadores de ligações de hidrogênio  $\leq 5$  (Lipinski *et al.*, 2012). O THL possui massa molar igual a 158,28 g/mol,  $\text{MLogP}$  de 2,84 e números adequados (com base na regra de Lipinski) de doadores e aceptores de ligações de hidrogênio, totalizando uma, que sugerem uma boa disponibilidade oral. Em relação ao  $\text{LogS}$  (-2,55) os valores encontrados para o composto estão dentro da faixa (-4 e -2), o que indica boa solubilidade em água.

Com relação ao comportamento frente ao modelo *boiled eggs* o THL (Figura 23) mostra uma alta probabilidade de ser absorvido pelo trato gastrointestinal e de permear a barreira hematoencefálica (BHE) (*pkCSM*:  $\log\text{BB} = 0,629 > 0,3$ ), podendo ser visualizado graficamente pelos pontos referentes a área físico-química do cérebro (gema), o que reforça o seu potencial frente à distúrbios neurológicos. Também pode-se observar que o THL não é possível substrato ou inibidor da glicoproteína *P* (*gp-P*) ou proteína de resistência a múltiplas drogas (MDR1) (Tabela 5). Essa informação é relevante devido a atuação da *gp-P* como bomba de efluxo, impedindo que a substância atinja a concentração terapêutica no corpo humano, ou permeie a BHE (Mealey *et al.*, 2010; Mohamed; El-Kadi, 2012). Por fim, a análise preditiva também demonstra que o THL não é substrato nem inibidor do sistema enzimático CYP450 em suas diferentes isoformas (Tabela 5). Esse grupo enzimático está envolvidos no metabolismo de xenobióticos e a interferência do monoterpeno poderia ser base para possíveis interações farmacocinéticas, afetando a eficácia e segurança de fármacos coadministrados (Silva *et al.*, 2022).



**Figura 23.** Perfil de absorção do composto tetrahidrolinalol (THL) pelo modelo *in silico* (Boiled-egg) via *SwissADME*. Legenda: barreira hemato encefálica (BHE); absorção gastrointestinal (AGI); substrato de proteína G + ou – (gP). Fonte: adaptado de *SwissADME* (2021).

**Tabela 5.** Potencial substrato *in silico* das isoformas do complexo citocromo P450 pelo composto THL.

(CYP)	THL
<b>CYP2D6 (Substrato)</b>	Não
<b>3A4 (Substrato)</b>	Não
<b>1A2 (Inibidor)</b>	Não
<b>2C19 (Inibidor)</b>	Não
<b>2C9 (Inibidor)</b>	Não
<b>2D6 (Inibidor)</b>	Não
<b>3A4</b>	Não

**Legenda:** citocromo P (CYP). Fonte: adaptado de *SwissADME* e *pkCSM* (2021).

A análise utilizando o *pkCSM* obteve parâmetros de logaritmo do coeficiente de permeabilidade aparente (modelo *in silico* construído a partir dos valores de permeabilidade de células adenocarcinoma Caco-2). Os valores obtidos são acima de 90 % ( $\log P_{app}$ ,  $\log \text{cm s}^{-1} > 0.9$ ) indicando alta probabilidade de absorção do THL no intestino delgado humano. Esses dados corroboram com os obtidos pela plataforma *Swiss ADME* ( $\text{TPSA} \leq 140 \text{ \AA}$ ). Com relação ao volume de distribuição no estado estacionário ( $\text{VD}_{ss}$ ) que indica o volume teórico de qual a dose global de uma droga precisaria ser uniformemente distribuída para garantir a mesma concentração plasmática, o THL apresenta valores baixos, o que pode interferir no perfil de distribuição adequado (Pires; Blundell; Ascher, 2015b; Silva *et al.*, 2020).

**Tabela 6.** Dados farmacocinéticos *in silico* estimados pelas plataformas SwissADME e pkCSM.

Composto	LogP	LogS <sup>b</sup>	TPSA (Å <sup>2</sup> ) <sup>c</sup>	Permeabilidade Caco-2 (log Papp; log cm/s) <sup>d</sup>	Abs. Int. (%) <sup>e</sup>	VDss (log L/kg) <sup>f</sup>	Fract. Unb. <sup>g</sup>
THL	2,89	2,55	20,23	1,328	93,27	0,049	0,361

**Legenda:** Coeficiente de partição (LogP/S); área de superfície polar topológica (TPSA); volume de distribuição (VDss). Fonte: adaptado de *SwissADME* e *pkCSM* (2021).

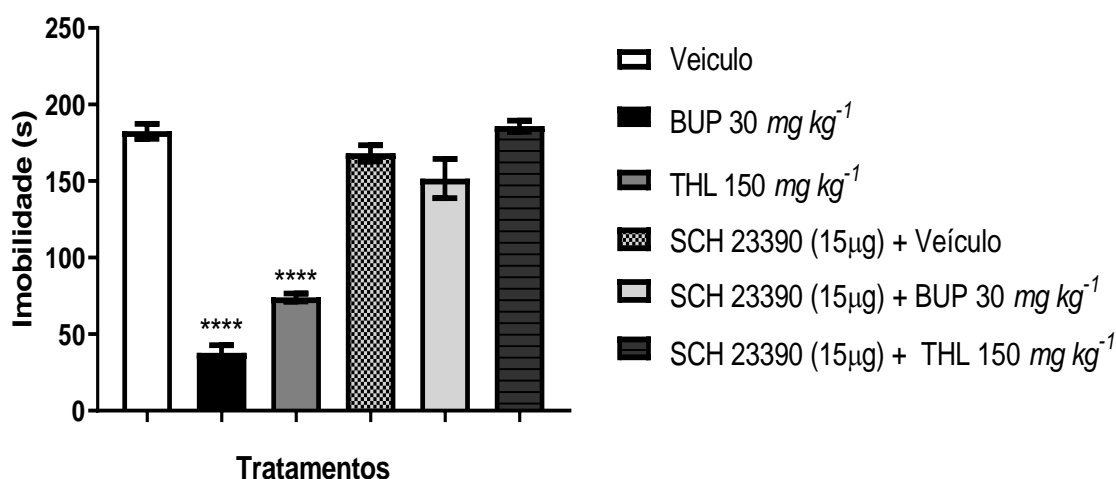
## 5.5 Investigação de possíveis mecanismos farmacológicos do THL *in vivo*

A partir dos resultados obtidos pelo docking molecular, foram observadas energias satisfatórias de interação nos alvos D<sub>1</sub>, NMDA, nNOs e GCs, quando comparados aos ligantes co-cristalizados. Esses dados sugerem uma possível atuação dos sistemas dopaminérgicos, glutamatérgicos e oxidonitrérgico no efeito antidepressivo-símile do THL. Sendo assim, foram investigados *in vivo* por meio do modelo de nado forçado o envolvimento desses sistemas, empregando respectivamente: um antagonista D<sub>1</sub> enantioesletivo, potencialização pela cetamina – um antagonista do receptor NMDA–, e o azul de metileno – um inibidor da GCs/NOs) –. Para o mecanismo dos receptores D<sub>1</sub> por não ter havido diferença significativa entre as doses farmacológicas do THL, foi utilizado a de 150 mg kg<sup>-1</sup>, onde foi observado a reversão do efeito pelo antagonista. Já para os mecanismos de potencialização, foi empregado a dose subativa do THL (75 mg kg<sup>-1</sup>). Esses resultados foram obtidos previamente pelo modelo de nado forçado.

### 5.5.1 Envolvimento do sistema dopaminérgico

De maneira a avaliar o envolvimento dos receptores D<sub>1</sub> no efeito antidepressivo-símile do THL no modelo do nado forçado, foi empregado o SCH 23390, um potente antagonista enantioesletivo dos receptores D<sub>1</sub>-like. Para tanto, grupos de camundongos (n = 6) foram tratados com veículo (salina 0,9% + tween 0,05% v.o) ou bupropiona (BUP mg kg<sup>-1</sup> v.o) ou THL (THL 150 mg kg<sup>-1</sup> v.o) isoladamente ou em associação ao SCH 23390 (15 µg i.p). Os resultados (Figura 24) mostraram que o grupo de camundongos tratados com a bupropiona 30 mg kg<sup>-1</sup> reduziu significativamente o tempo de imobilidade (TI) em 79% (37,8 ± 4.8 s), em relação ao

grupo veículo ( $182,5 \pm 4,9$  s). De forma semelhante, a exposição aguda ao THL nas doses de ( $150 \text{ mg kg}^{-1}$ ) reduziu significativamente o TI em 59% ( $74 \pm 4,9$  s) em relação ao grupo veículo. Já os grupos que tiveram associação com o SCH 23390 não demonstraram redução significativa no IT, sendo eles SCH ( $15 \mu\text{g}$ ) + veículo ( $168,2 \pm 5,3$  s), SCH 23390 ( $15 \mu\text{g}$ ) + Bupropiona ( $30 \text{ mg kg}^{-1}$ ) ( $151,7 \pm 12,72$  s) e SCH 23390 ( $15 \mu\text{g}$ ) + THL ( $150 \text{ mg kg}^{-1}$ ) ( $185,8 \pm 3,6$  s).



**Figura 24.** Tempo de imobilidade no modelo do Nado Forçado na avaliação do efeito antidepressivo-símile do tetrahidrolinalol (THL) por meio de receptores  $D_1$ . Nota: Nota: A coluna representa a média  $\pm$  EPM ( $n = 6$ ). Análise estatística: ANOVA unidirecional seguida do teste de Tukey, \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,001$ , \*\*\*  $p < 0,0001$ .

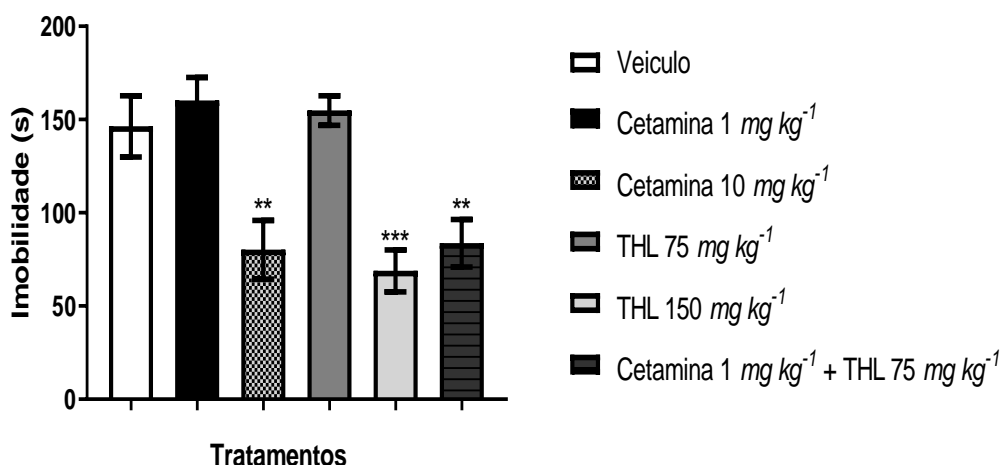
Esses resultados sugerem que a associação do THL na dose antidepressiva com o SCH 23390 é capaz de promover uma reversão da diminuição do tempo de imobilidade no modelo do nado forçado quando comparado ao grupo THL administrado isoladamente, indicando uma possível via de atuação em receptores  $D_1$ . Esses receptores quando ativados, melhoram as características fenotípicas da depressão devido ao seu impacto na regulação de neurotransmissores (aumento de dopamina e serotonina) e sistemas de sinalização (cAMP/PKA), promovendo a excitabilidade celular. Estudos também tem demonstrado que fármacos que atuam em receptores  $D_1$  aumentam fatores transcricionais envolvidos na plasticidade sináptica e na neurogênese em regiões hipocampais do giro denteado (BDNF, EGFP) (Shuto *et al.*, 2020).

De maneira a complementar a possível ação do THL via receptores  $D_1$ -like, foi observado que seu precursor, o linalol, também apresenta possível ação via receptores  $D_1$ . Os estudos realizados por Gusmán-Gutiérrez *et al.* (2015) com camundongos, demonstrou que a associação

do SCH23390 junto ao linalol levou ao aumento do tempo de imobilidade dos animais no modelo do nado Forçado, quando comparado ao grupo que recebeu apenas o linalol. O que demonstra que o seu precursor, o THL, também poderá atuar de maneira semelhante regulando mecanismos dopaminérgicos.

### 5.5.2 Envolvimento do sistema glutamatérgico

Para avaliar o envolvimento da via glutamatérgica no efeito antidepressivo-símile do THL no modelo do nado forçado, foi realizado um estudo de potencialização de efeito do monoterpeneo com a cetamina, um antagonista do receptor NMDA. Para tanto, grupos de camundongos ( $n = 6$ ) foram tratados com veículo (Tween 80 a 0,5% em NaCl a 0,9% v.o) ou THL (150 e 75  $mg\ kg^{-1}$  v.o) ou cetamina (1 e 30  $mg\ kg^{-1}$  i.p) isoladamente ou associados (THL 75  $mg\ kg^{-1}$  v.o + cetamina 1  $mg\ kg^{-1}$  i.p). Os resultados (Figura 25) indicam que os grupos que receberam as doses ativas da cetamina (10  $mg\ kg^{-1}$ ) e THL (150  $mg\ kg^{-1}$ ) apresentaram redução significativa do tempo de imobilidade em 45,2 % ( $80,17 \pm 15,78$ ) e 52,96 % ( $68,83 \pm 4,56$ ), respectivamente, em relação ao grupo veículo ( $146,30 \pm 16,40$  s). De forma similar, o grupo que recebeu a associação da cetamina 1  $mg\ kg^{-1}$  + THL 75  $mg\ kg^{-1}$  também demonstrou uma significativa redução do tempo de imobilidade de 42,88 % ( $83,57 \pm 5,17$ ) quando comparado ao grupo tratado com salina. Já os grupos que receberam as doses subativas da cetamina (1  $mg\ kg^{-1}$ ) ( $160,20 \pm 12,41$ ) e do THL (75  $mg\ kg^{-1}$ ) ( $154,80 \pm 7,86$ ) não apresentaram diferença no tempo de imobilidade, em comparação ao grupo controle ( $146,30 \pm 16,40$ ).



**Figura 25.** Tempo de imobilidade no modelo do nado forçado na avaliação do efeito antidepressivo-símile do tetrahidrolinalol (THL) pela via glutamatérgica. Nota: Nota: A coluna representa a média  $\pm$  EPM (n = 6). Análise estatística: ANOVA unidirecional seguida do teste de Tukey, \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,001$ , \*\*\*  $p < 0,0001$ .

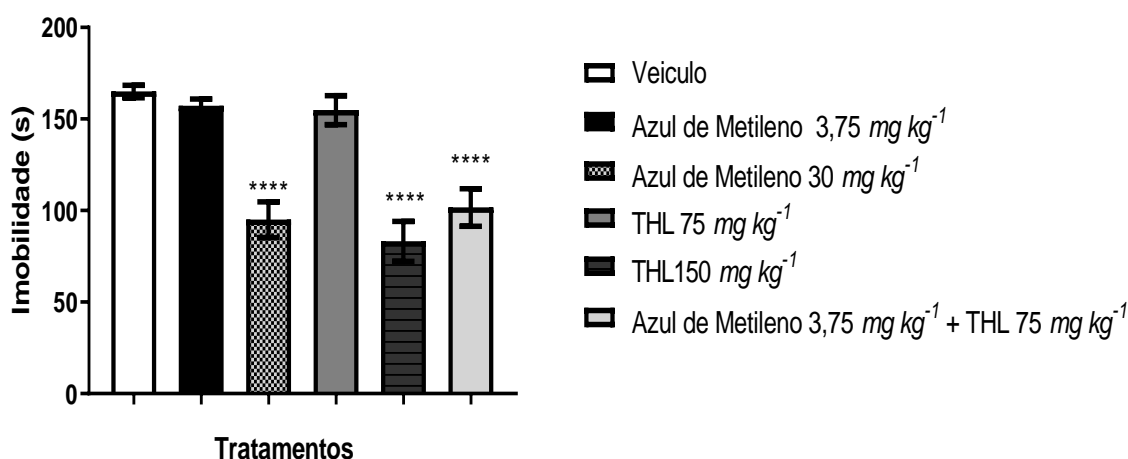
Estes resultados preliminares sugerem que os animais tratados com o THL e a cetamina de maneira sinérgica potencializam o efeito antidepressivo-símile, provavelmente, por um mecanismo envolvendo o bloqueio do receptor NMDA. Estudos pré-clínicos têm demonstrado que antagonistas como a cetamina e análogos (fenciclidina e dizocilpina) atuam diminuindo a atividade do canal, reduzindo o influxo de  $Ca^{2+}$  e as correntes mediadas pelo receptor NMDA. A cetamina atua na fisiopatologia de desordens psiquiátricas em doses subanestésicas, atingindo o tecido cerebral em concentrações micromolares (Niciu *et al.*, 2014; Zorumski *et al.*, 2016). É importante ressaltar que existe um grande interesse pelo potencial terapêutico da cetamina em razão da sua rápida ação antidepressiva, contrastando fortemente com os efeitos retardados dos antidepressivos tradicionais. Atualmente, acredita-se que o mecanismo dessa droga se dá por ativar a jusante do BDNF e vias de sinalização do alvo mecanicístico da rapamicina (mTOR), potencializando a plasticidade sináptica (Matveuchuk *et al.*, 2020).

### 5.5.3 Envolvimento do sistema oxidonitrérgico

O óxido nítrico (NO) tem sido relacionado como um importante neuromodulador envolvido com a neurobiologia da adaptação ao estresse e à depressão. A administração sistêmica ou intra-hipocampal de inibidores da NO sintase neuronal (nNOS) induz efeitos do tipo antide-

pressivo em modelos animais. Sendo assim, no modelo empregado, foi utilizado o azul de metileno, que atua como inibidor não seletivo da óxido nítrico sintase (NOS) e da Guanilato Ciclase (GCs) solúvel. É importante ressaltar que a disfunção da cascata do óxido nítrico NO-guanosina Monofosfato cíclico (GMPc) está fortemente ligada às desordens de humor, ansiedade, psicoses e depressão. Logo, a inibição dessa via pode ser considerada importante estratégia na modulação desses quadros (Bem-Azu *et al.*, 2019).

Nesse sentido, foi realizado um teste de potencialização utilizando de doses subativas do THL e do azul de metileno, a fim de se verificar se esta associação seria capaz de reduzir o tempo de imobilidade, quando comparado ao grupo controle (Figura 27). Sendo assim, os resultados demonstram que os grupos que receberam as doses ativas do azul de metileno ( $30 \text{ mg kg}^{-1}$  i.p) e THL ( $150 \text{ mg kg}^{-1}$  v.o), reduziram significativamente o tempo de imobilidade em 42,42 % ( $95 \pm 9,795$ ) e 49.59 % ( $83,17 \pm 4,438$ ), respectivamente, em relação ao grupo veículo ( $165,0 \pm 3,347$ ). De forma similar, o grupo que recebeu a associação das doses subativas do azul de metileno ( $3,75 \text{ mg kg}^{-1}$  i.p) e THL  $75 \text{ mg kg}^{-1}$  v.o ( $101,7 \pm 4,193$ ) também demonstrou uma significativa redução do tempo de imobilidade de 38,36 % quando comparado ao grupo tratado com salina. Por fim, o grupo de animais que recebeu apenas a dose subativa de azul de metileno ( $3,75 \text{ mg kg}^{-1}$ ) ( $157,2 \pm 3,692$ ) não foi capaz de diminuir o tempo de imobilidade quando comparado ao grupo controle ( $165,0 \pm 3,347$ ), o que se repete quando foi administrada a dose subativa do THL de  $75 \text{ mg kg}^{-1}$  ( $154,8 \pm 7,867$ ), que também não foi capaz de induzir efeito antidepressivo-símile.

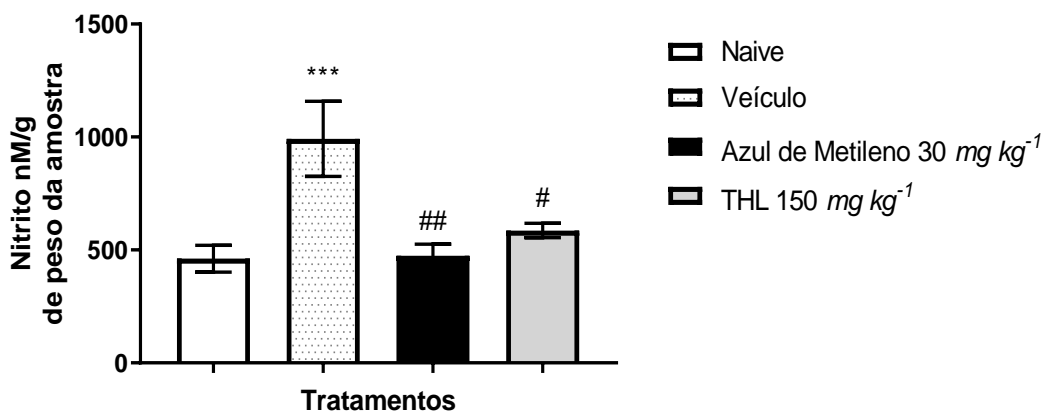


**Figura 26.** Tempo de imobilidade no modelo do Nado Forçado na avaliação do efeito antidepressivo-símile do tetrahidrolinalol (THL) pela via oxidonitrérgica. Nota: A coluna representa

a média  $\pm$  EPM (n = 6). Análise estatística: ANOVA unidirecional seguida do teste de Tukey, \* p<0,05, \*\* p<0,001, \*\*\* p<0,0001.

Estes resultados sugerem que a associação de uma dose subativa do THL com uma dose subativa do azul de metileno é suficientemente capaz de promover redução do tempo de imobilidade no modelo e, portanto, pode apresentar potencial antidepressivo-símile, possivelmente, pela inibição da via oxidonitrérgica. De forma similar, Bem-Azu *et al.* (2019) investigaram o papel da via L-arginina/NO na depressão e na memória e observaram que a Morina, um composto aromático da classe dos flavonoides, apresentou comportamento semelhante ao THL. No estudo, a dose subativa de azul de metileno ( $3,75 \text{ mg kg}^{-1}$ ) em associação com a dose subativa da morina ( $100 \text{ mg kg}^{-1}$ ) foi capaz de reduzir significativamente o tempo de imobilidade dos animais quando comparado ao grupo controle, no modelo do nado forçado.

De forma complementar, foi dosado o nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ), que é um subproduto do metabolismo do óxido nítrico e pode estar envolvido indiretamente na neuroinflamação e no estresse oxidativo. Desse modo, com relação aos resultados, pode-se observar que o grupo tratado com o veículo aumentou significativamente a concentração de nitrito ( $991,8 \pm 165,8$ ) em 114,9 % quando comparado ao grupo basal (*naive*) ( $461,5 \pm 59,75$ ), cujos animais não receberam nenhum tratamento e não foi submetido ao modelo do nado forçado que atua como um estímulo estressor. Diferentemente, os animais tratados com as doses do THL  $150 \text{ mg kg}^{-1}$  ( $586,2 \pm 31,49$ ) e azul de metileno  $30 \text{ mg kg}^{-1}$  ( $474,7 \pm 51,19$ ), que reduziram significativamente a produção do nitrito em 40,89 e 52,14 %, respectivamente, quando comparados ao grupo veículo.



**Figura 27.** Concentração de nitrito (nM/g de peso da amostra) em grupos que receberam doses ativas de tetrahidrolinalol e azul de metileno. Nota: A coluna representa a média  $\pm$  EPM (n =

6). Análise estatística: ANOVA unidirecional seguida do teste de Tukey, “\*” = vs Naive; “#” = vs Veículo, \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,001$ , \*\*\*  $p < 0,0001$ , #  $p < 0,05$ , ##  $p < 0,001$ .

O óxido nítrico por sua vez, possui diversas funções homeostáticas e na inflamação. Nos transtornos de depressão o cérebro apresenta um quadro de inflamação de baixa intensidade, no qual induzem a produção de óxido nítrico pelas por astrócitos e micróglia. Esse mediador por sua vez em excesso, pode causar toxicidade neuronal em decorrência da formação de espécies reativas de nitrogênio, culminando com a morte de células tronco mesenquimais, cujos danos neuronais podem alterar a plasticidade sináptica (Liy *et al.*, 2021). De modo geral, resumidamente, o THL pode atuar inibindo correntes despolarizantes via receptores NMDA, cujo influxo de  $Ca^{2+}$  anormal nos neurônios pós-sinápticos poderá contribuir com a superestimulação da nNOs aumentando a síntese de NO, ou por meio de uma inibição direta da GCs. Com isso, a redução do NO, minimiza o estresse oxidativo, conseqüentemente, implica a menores danos neuronais que interferem em sinalizações e processos envolvidos na neurogênese.

## 6 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos, pode-se concluir que o THL apresentou baixo perfil de toxicidade, sem induzir a alterações comportamentais, fisiológicas, morfológicas e histológicas nas condições experimentais testadas. Nos testes de ansiedade, foram observadas diferenças significativas no número de entradas nos braços abertos do LCE e no seu respectivo tempo permanência na dose de 37,5 e 75 mg kg<sup>-1</sup>. Nas doses de 37,5 e 75 mg kg<sup>-1</sup> não foram identificados efeitos sedativos e miorelaxante avaliados no ensaio de campo aberto e *rota rod*, respectivamente – o que denota que o composto é destituído de efeitos sobre a atividade locomotora. Com relação à atividade antidepressiva-símile, foi observado que o tratamento com o monoterpene reduziu o tempo de imobilidade nos animais submetidos ao ensaio de natação forçada, empregando a dose de 150 mg kg<sup>-1</sup>.

Na predição de possíveis alvos envolvidos na atividade antidepressiva, o ensaio de docking molecular demonstrou que o THL apresentou valores de energia satisfatórios em alvos como: nNOs, GCs, IL-6, 5-HT<sub>1A</sub>, com resultados superiores ao padrão co-cristalizado nos receptores NMDA e D<sub>1</sub>. Esses resultados puderam ser corroborados nos ensaios *in vivo*, onde se foi possível evidenciar reversão do efeito quando empregado um antagonista D<sub>1</sub> enantioseletivo e um sinergismo farmacológico quando utilizados doses subterapêuticas de antagonista do NMDA – cetamina – e da GCs/NO – azul de metileno- com redução dos níveis de nitrito em estrutura de córtex e hipocampo. A substância em questão também apresenta características físico-químicas e farmacocinéticas que predizem uma boa biodisponibilidade *in silico*. A partir desses estudos pioneiros iniciais é possível concluir que o THL reúne condições de continuidade das pesquisas direcionadas à busca de um possível medicamento ansiolítico e antidepressivo.

## REFERÊNCIAS

- ABDALLAH, C. G. *et al.* The neurobiology of depression, ketamine and rapid-acting antidepressants: Is it glutamate inhibition or activation? **Pharmacology & Therapeutics**, v. 190, p. 148–158, 2018.
- ALDERTON, W. K.; COOPER, C. E.; KNOWLES, R. G. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. **Biochemical Journal**, v. 357, n. 3, p. 593-615, 2001.
- AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fifth Edition (DSM-V-TR). Arlington, VA: **American Psychiatric Association**, 2022.
- AMINI KHOEI, H. *et al.* Possible involvement of l arginine nitric oxide pathway in the antidepressant activity of Auraptene in mice. **Behavioral and Brain Functions**, v. 18, n. 4, 2022.
- ANTIÓRIO, A. T. *et al.* Mouse Behavior in the Open-field Test after Meloxicam Administration. **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science**, v. 61, n. 3, p. 270–274, 2022.
- ANTKIEWICZ-MICHALUK, L. *et al.* Antidepressant-like Effect of Tetrahydroisoquinoline Amines in the Animal Model of Depressive Disorder Induced by Repeated Administration of a Low Dose of Reserpine: Behavioral and Neurochemical Studies in the Rat. **Neurotoxicity Research**, v. 26, n. 1, p. 85–98, 2014.
- ARCHER, J. Tests for emotionality in rats and mice: A review. **Animal Behaviour**, v. 21, n. 2, p. 205–235, 1973.
- ARMARIO, A. The forced swim test: Historical, conceptual and methodological considerations and its relationship with individual behavioral traits. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 128, p. 74–86, set. 2021.
- ARTIGAS, F. Serotonin receptors involved in antidepressant effects. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 137, n. 1, p. 119–131, 2013.
- ASNIS, G. M.; SANDERSON, W. C.; VAN PRAAG, H. M. Cortisol response to intramuscular desipramine in patients with major depression and normal control subjects: A replication study. **Psychiatry Research**, v. 44, n. 3, p. 237–250, 1992.
- BAIK, J.-H. Dopamine Signaling in reward-related behaviors. **Frontiers in Neural Circuits**, v. 7, 2013.
- BAKER, H. J. *et al.* The Effectiveness of Psychological Therapies for Anxiety Disorders in Adolescents: A Meta-Analysis. **Clin Child Fam Psychol Rev**, 2021.
- BALDWIN, D. S. *et al.* 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.

BAL-PRICE, A.; BROWN, G. C. Inflammatory Neurodegeneration Mediated by Nitric Oxide from Activated Glia-Inhibiting Neuronal Respiration, Causing Glutamate Release and Excitotoxicity. *The Journal of Neuroscience*, v. 21, n. 17, p. 6480–6491, 1 set. 2001.

BATISTA *et al.* Evidence for the involvement of ionotropic glutamatergic receptors on the antinociceptive effect of (-)-linalool in mice. *Neuroscience Letters*, v. 440, n. 3, p. 299-303, 2008.

BATISTA *et al.* Inhibition of TRPA1 and NMDA channels contributes to anti-nociception induced by (-)-linalool. *The Journal of Pain*, v. 12, n. 4, p. 30, 2011.

BELSITO, D.; BICKERS, D.; BRUZE, M.; CALOW, P. GREIM, H.; HANIFIN, J. M.; ROGERS, A. E.; SAURAT, J. H.; SIPES, I. G.; TAGAMI, H. A safety assessment of noncyclic alcohols with unsaturated branched chain when used as fragrance ingredients: The RIFM expert panel. *Food and Chemical Toxicology*, v. 48, suppl. 3, p. S1-S42, 2010.

BEN-AZU, B. *et al.* Involvement of L-arginine-nitric oxide pathway in the antidepressant and memory promoting effects of morin in mice. *Drug Development Research*, v. 80, n. 8, p. 1071-1079, 2019.

BERNSTEIN, F. C. *et al.* The protein data bank: A computer-based archival file for macromolecular structures. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 185, n. 2, p. 584–591, 1978.

BERRIDGE, C. W.; WATERHOUSE, B. D. The locus coeruleus–noradrenergic system: modulation of behavioral state and state-dependent cognitive processes. *Brain Research Reviews*, v. 42, n. 1, p. 33–84, abr. 2003.

BEUREL, E.; TOUPS, M.; NEMEROFF, C. B. The Bidirectional Relationship of Depression and Inflammation: **Double Trouble**. *Neuron*, v. 107, n. 2, p. 234–256, 2020.

BIANCHINI, A. E. *et al.* Monoterpenoids (Thymol, carvacrol and S-(+)-linalool) with anesthetic activity in *silver catfish* (*Rhamdia quelen*): Evaluation of acetylcholinesterase and GABAergic activity. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 50, n. 12, p. 1–8, 2017.

BLEAKLEY, STEPHEN; SIMON, J. C. The pharmacological management of anxiety disorders. *Progress in Neurology and Psychiatry*, v. 18, n. 6, p. 27-32, 2014.

BOURNE J. A. SCH 23390: the first selective dopamine D1-like receptor antagonist. *CNS Drug Review*, n. 7, v. 4, p. 399-414, 2001.

BRUM; SOUZA. Effects of linalool on [(3)H]MK801 and [(3)H] muscimol binding in mouse cortical membranes. *Phytotherapy Research*, v. 15, n.5, p. 422-425, 2001.

CAI, L. *et al.* Antidepressant-like effects of penta-acetyl geniposide in chronic unpredictable mild stress-induced depression rat model: Involvement of inhibiting neuroinflammation in prefrontal cortex and regulating hypothalamic-pituitaryadrenal axis. *International Immunopharmacology*, v. 80, 106182, 2020.

CALIXTO, A. V., DUARTE, F. S., DUZZIONI, M., HÄCKL, L. N., FARIA, M. S., DE LIMA, T. C. M. Role of ventral hippocampal nitric oxide/cGMP pathway in anxiety-related behaviors in rats submitted to the elevated T-maze. **Behavioural brain research**, v. 207, n. 1, p. 112-117, 2010.

CALIXTO, P. S. *et al.* *In Silico* Study Examining New Phenylpropanoids Targets with Antidepressant Activity. **Current Drug Targets**, v. 22, n. 5, p. 539–554, 2020.

CAMPOS, A. C. *et al.* Animal models of anxiety disorders and stress. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 35, n. SUPPL.2, p. 101–111, 2013.

CAN, A.; DAO, D. T.; GOULD, T. D.. The mouse forced swim test. **Journal of Visualized Experiments**, n. 58, p. 4–8, 2011.

CHANG, H. T. *et al.* Evaluation of Motor Coordination and Antidepressant Activities of *Cinnamomum osmophloeum* ct. Linalool Leaf Oil in Rodent Model. **Molecules**, v. 26, n. 10, p. 16–18, 2021.

CHENG, B. H.; SHEEN, L. Y.; CHANG, S. T. Evaluation of anxiolytic potency of essential oil and S-(+)-linalool from *Cinnamomum osmophloeum* ct. linalool leaves in mice. **Journal of Traditional and Complementary Medicine**, v. 5, n. 1, p. 27–34, 2015.

CHOI, K. W.; KIM, Y.-K.; JEON, H. J. Comorbid Anxiety and Depression: Clinical and Conceptual Consideration and Transdiagnostic Treatment. Em: KIM, Y.-K. (Ed.). *Anxiety Disorders*. Singapore: **Springer Singapore**, v. 1191, p. 219–235. 2020.

CLEARE, A. *et al.* Evidence-based guidelines for treating depressive disorders with antidepressants: A revision of the 2008 **British Association for Psychopharmacology guidelines**, v. 29, 2008.

COLEMAN, J. W. Nitric oxide in immunity and inflammation. **International immunopharmacology**, v. 1, n. 8, p. 1397-1406, 2001.

CRUZ, A. D.; LANDEIRA-FERNANDEZ, J. Modelos animais de ansiedade e o estudo experimental de drogas serotoninérgicas. **Métodos em neurociência**, p. 192-217, 2012.

CZÉH, B. *et al.* Animal models of major depression and their clinical implications. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 64, p. 293–310, 2016.

DAINA, A. ZOETE, V. A. BOILED-Egg To Predict Gastrointestinal Absorption and Brain Penetration of Small Molecules. **ChemMedChem**, v. 11, n. 11, p. 1117-1121, 2016.

DAINA, A.; MICHELIN, O.; ZOETE, V. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. **Scientific Reports**. v. 7, p. 42717, 2017.

DANTISUJI, M. *et al.* 5-HT 2A receptor activation enhances NMDA receptor-mediated glutamate responses through Src kinase in the dendrites of rat jaw-closing motoneurons. **The Journal of Physiology**, v. 597, n. 9, p. 2565–2589, 2019.

DAUBNER, S. C.; LE, T.; WANG, S. Tyrosine hydroxylase and regulation of dopamine synthesis. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 508, n. 1, p. 1–12, 2011.

DE ALMEIDA, A. A. C.; COSTA, J. P.; DE CARVALHO, R. B. F.; DE SOUSA, D. P.; DE FREITAS, R. M. Evaluation of acute toxicity of a natural compound (+)-limonene epoxide and its anxiolytic-like action. **Brain Research**, v. 1448, p. 56–62, 2012.

DEMARTINI, J.; PATEL, G.; FANCHER, T. L. Generalized Anxiety Disorder. *Annals of Internal Medicine*, v. 170, n. 7, p. ITC49, 2 abr. 2019.

DEMYTTENAERE, K.; HEIRMAN, E. The blurred line between anxiety and depression: hesitations on comorbidity, thresholds and hierarchy. *International Review of Psychiatry*, v. 32, n. 5–6, p. 455–465, 17 ago. 2020.

DENNINGER, J. W.; MARLETTA, M. A. Guanylate cyclase and the NO/cGMP signaling pathway. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics**, v. 1411, n. 2-3, p. 334-350, 1999.

DERANGEON, M. *et al.* 5-HT<sub>4</sub> and 5-HT<sub>2</sub> receptors antagonistically influence gap junctional coupling between rat auricular myocytes. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, v. 48, n. 1, p. 220–229, 2010.

DEURWAERDERE, P.; DI GIOVANNI, G. 5-HT interaction with other neuro-transmitters: An overview. **Progress in Brain Research**, v. 259, p. 1-5, 2021.

DINIZ, T. C. *et al.* Anticonvulsant, sedative, anxiolytic and antidepressant activities of the essential oil of *Annona vepretorum* in mice: Involvement of GABAergic and serotonergic systems. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 111, p. 1074–1087, 2019.

DOS SANTOS SAMPAIO, T. I. *et al.* Leaves of *Spondias mombin* L. a traditional anxiolytic and antidepressant: Pharmacological evaluation on zebrafish (*Danio rerio*). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 224, p. 563–578, 2018.

DOS SANTOS, E. *et al.* Contribution of spathulenol to the anti-nociceptive effects of *Psidium guineense*. **Nutritional Neuroscience**, v. 25, n. 4, p. 812–822, 2022.

DOS SANTOS, E. R. *et al.* Linalool-rich essential oils from the Amazon display antidepressant-type effect in rodents. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 212, p. 43–49, 2018.

DUDEK, K. A. *et al.* Neurobiology of resilience in depression: immune and vascular insights from human and animal studies. *European Journal of Neuroscience*, v. 53, n. 1, p. 183–221, jan. 2021.

EDINOFF, A. N. *et al.* Selective Serotonin Reuptake Inhibitors and Adverse Effects: A Narrative Review. **Neurology International**, v. 13, n. 3, p. 387–401. 2021.

ERHIRHIE, E. O.; IHEKWEREME, C. P.; ILODIGWE, E. E. Advances in acute toxicity testing: Strengths, weaknesses and regulatory acceptance. **Interdisciplinary Toxicology**, v. 11, n. 1, p. 5–12, 2018.

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

FERNANDES, L. C. B. *et al.* Essential Oils in Experimental Models of Neuropsychiatric Disorders: A Systematic Review. **Current Neuropharmacology**, v. 19, n. 10, p. 1738–1759, 2021.

FIKSDAL, A. *et al.* Associations between symptoms of depression and anxiety and cortisol responses to and recovery from acute stress. **Psychoneuroendocrinology**, v. 102, p. 44–52, 2019.

FILE, S. E.; GONZALEZ, L. E.; ANDREWS, N. Comparative Study of Pre- and Postsynaptic 5-HT 1A Receptor Modulation of Anxiety in Two Ethological Animal Tests. **The Journal of Neuroscience**, v. 16, n. 15, p. 4810–4815, 1996.

FIORI, L. M.; GROSS, J. A.; TURECKI, G. Effects of histone modifications on increased expression of polyamine biosynthetic genes in suicide. **The International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 15, n. 8, p. 1161–1166, 2012.

FITZGERALD, P. J.; YEN, J. Y.; WATSON, B. O. Stress-sensitive antidepressant-like effects of ketamine in the mouse forced swim test. **Plos one**, v. 14, n. 4, p. 30986274, 2019.

FRANCESCHELLI, A. *et al.* Sex differences in the chronic mild stress model of depression. **Behavioural Pharmacology**, v. 25, n. 5 and 6, p. 372–383, 2014.

FURUKAWA, Toshi A. *et al.* 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.

GAMA, K. B.; QUINTANS, J. S. S.; ANTONIOLLI, A. R.; QUINTAN-JÚNIOR, L. J.; SANTANA, W. A.; BRANCO, A.; SOARES, M. B. P.; VILLARREAL, C. F. Evidence for the Involvement of Descending Pain-Inhibitory Mechanisms in the Antinociceptive Effect of Hecogenin Acetate. **Journal of Natural Products**, v. 76, n. 4, p. 5590563, 2013.

GAO, S. F. *et al.* Nitric oxide synthase and nitric oxide alterations in chronically stressed rats: a model for nitric oxide in major depressive disorder, **Psychoneuroendocrinology**, v. 47, p. 136–140, 2014.

GARCIA-GARCIA, A. L.; NEWMAN-TANCREDI, A.; LEONARDO, E. D. P5-HT1A receptors in mood and anxiety: recent insights into autoreceptor versus heteroreceptor function. **Psychopharmacology**, v. 231, n. 4, p. 623–636, 2014.

GARCÍA-RÍOS, R. I. *et al.* “Anxiolytic-like effect of the aqueous extract of *Justicia spicigera* leaves on female rats: A comparison to diazepam.” **Phytomedicine: international journal of phytotherapy and phytopharmacology**, v. 55, p 9-13, 2019.

- GARTLEHNER, G. *et al.* 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.
- GERSHON, A. A.; VISHNE, T.; GRUNHAUS, L. Dopamine D2-Like Receptors and the Antidepressant Response. **Biological Psychiatry**, v. 61, n. 2, p. 145–153, 2007.
- GIBSON-SMITH, D. *et al.* Association of food groups with depression and anxiety disorders. **European Journal of Nutrition**, v. 59, n. 2, p. 767–778, 2020.
- GIRISH, C.; RAJ, V.; ARYA, J.; BALAKRISHNAN, S. Evidence for the involvement of the monoaminergic system, but not the opioid system in the antidepressant-like activity of ellagic acid in mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 682, n. 1–3, p. 118–125, 2012.
- GOMES, P. B. *et al.* Anxiolytic-like effect of the monoterpene 1,4-cineole in mice. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 96, n. 3, p. 287–293, 2010.
- GOODARZI, P. *et al.* Development and validation of Alzheimer’s Disease Animal Model for the Purpose of Regenerative Medicine. **Cell and Tissue Banking**, v. 20, n. 2, p. 141–151, 2019.
- GOODWIN, G. M.; STEIN, D. J. Generalised Anxiety Disorder and Depression: Contemporary Treatment Approaches. **Advances in Therapy**, v. 38, n. S2, p. 45–51, 2021.
- GOULD, E. Serotonin and Hippocampal Neurogenesis. **Neuropsychopharmacology**, v. 21, n. 2, p. 46S-51S, 1999.
- GU, S. M. *et al.* Dopamine D1 receptor antagonist reduces stimulant-induced conditioned place preferences and dopamine receptor supersensitivity. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 393, p. 131-138, 2020
- GUTIÉRREZ, H. C. *et al.* Nitric oxide interacts with monoamine oxidase to modulate aggression and anxiety-like behaviour. **European Neuropsychopharmacology**, v. 30, p. 30-43, 2020.
- GUZMÁN-GUTIÉRREZ, S. L. *et al.* Linalool and  $\beta$ -pinene exert their antidepressant-like activity through the monoaminergic pathway. **Life Sciences**, v. 128, p. 24–29, 2015.
- GUZMÁN-GUTIÉRREZ, S. L. *et al.* Antidepressant activity of *Litsea glaucescens* essential oil: Identification of  $\beta$ -pinene and linalool as active principles. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 143, n. 2, p. 673–679, 2012.
- HANDLEY, S. L.; MITHANI, S. Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of fear-motivated behaviour. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 327, n. 1, p. 1–5, 1984.
- HANDLEY, S. L.; SIDDIKA M. Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of ‘fear’-motivated behaviour. **Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology**, v. 327, n. 1, p. 1-5, 1984.

- HAO, Y. *et al.* Selecting an Appropriate Animal Model of Depression. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 19, p. 4827, 2019.
- HARADA, H.; KASHIWADANI, H.; KANMURA, Y.; KUWAKI, T. Linalool odor-induced anxiolytic effects in mice. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 12, n. 241, p. 1–8, 2018.
- HARRO, J. Animal models of depression: pros and cons. **Cell and Tissue Research**, v. 377, n. 1, p. 5–20, 2019.
- HARTLEY, N.; MCLACHLAN, C. S. Aromas Influencing the GABAergic System. **Molecules**, v. 27, n. 8, p. 2414, 2022.
- HASSANZADEH, S.-A.; ABBASI-MALEKI, S.; MOUSAVI, Z. Anti-depressive-like effect of monoterpene trans-anethole via monoaminergic pathways. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 29, n. 5, p. 3255–3261, 2022.
- HASHIMOTO, K. Essential Role of Keap1-Nrf2 Signaling in Mood Disorders: Overview and Future Perspective. **Frontiers in Pharmacology**, v. 16, n. 9, p. 1182, 2018.
- HEATH, F. C. *et al.* Dopamine D1-like receptor signalling in the hippocampus and amygdala modulates the acquisition of contextual fear conditioning. **Psychopharmacology**, v. 232, n. 14, p. 2619–2629, 2015.
- HERR, N.; BODE, C.; DUERSCHMIED, D. The effects of serotonin in immune cells. **Frontiers Cardiovasc. Med.**, v. 4, n. 48, 2017.
- HIMANSHU *et al.* A Review of Behavioral Tests to Evaluate Different Types of Anxiety and Anti-anxiety Effects. **Clinical Psychopharmacology and Neuroscience**, v. 18, n. 3, p. 341–351, 2020.
- HIMANSHU *et al.* A Review of Behavioral Tests to Evaluate Different Types of Anxiety and Anti-anxiety Effects. **Clinical Psychopharmacology and Neuroscience**, v. 18, n. 3, p. 341–351, 2020.
- HOBARA, T. *et al.* Altered gene expression of histone deacetylases in mood disorder patients. **Journal of Psychiatric Research**, v. 44, n. 5, p. 263–270, 2010.
- HOGG, N.; KALYANARAMAN, B. Nitric oxide and lipid peroxidation. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics**, v. 1411, n. 2-3, p. 378-384, 1999.
- HOLLAND, N.; ROBBINS, T. W.; ROWE, J. B. The role of noradrenaline in cognition and cognitive disorders. **Brain**, v. 144, n. 8, p. 2243–2256, 2021.
- HOMAN, P. *et al.* Serotonin versus catecholamine deficiency: behavioral and neural effects of experimental depletion in remitted depression. **Translational Psychiatry**, v. 5, n. 3, p. e532–e532, 2015.
- HUGHES, M. The principles of humane experimental technique [internet]. Johns Hopkins Bloomberg Sch. **Public Health**. 2019.

- IGA, J. *et al.* Altered HDAC5 and CREB mRNA expressions in the peripheral leukocytes of major depression. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 31, n. 3, p. 628–632, 2007.
- ISYAKU, Y.; UZAIRU, A.; UBA, S. Computational studies of a series of 2-substituted phenyl-2-oxo-, 2-hydroxyl- and 2-acyloxyethylsulfonamides as potent anti-fungal agents. **Heliyon**, v. 6, n. 4, p. e03724, 2020.
- JOCA, S. R. *et al.* Nitric oxide signalling and antidepressant action revisited. **Cell and Tissue Research**, v. 377, n. 1, p. 45–58, 2019.
- Ji *et al.* Xiaoyao Pills Ameliorate Depression-like Behaviors and Oxidative Stress Induced by Olfactory Bulbectomy in Rats via the Activation of the PIK3CA-AKT1-NFE2L2/BDNF Signaling Pathway. **Frontiers in Pharmacology**, v. 12, p.643456, 2021.
- KALUEFF, A. V.; TUOHIMAA, P. Experimental modeling of anxiety and depression. **Acta Neurobiologiae Experimentalis**, v. 64, n. 4, p. 439–448, 2004.
- KASPER, S. *et al.* Silexan, an orally administered *Lavandula* oil preparation, is effective in the treatment of “subsyndromal” anxiety disorder: A randomized, double-blind, placebo controlled trial. **International Clinical Psychopharmacology**, v. 25, n. 5, p. 277–287, 2010.
- KATZ, R. J.; ROTH, K. A.; CARROLL, B. J. Acute and chronic stress effects on open field activity in the rat: Implications for a model of depression. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 5, n. 2, p. 247–251, 1981.
- KAUFMAN, J. *et al.* The 5-HT1A receptor in Major Depressive Disorder. **European Neuropsychopharmacology**, v. 26, n. 3, p. 397–410, 2016.
- KENDLER, K. S.; KARKOWSKI, L. M.; PRESCOTT, C. A. Causal Relationship Between Stressful Life Events and the Onset of Major Depression. **American Journal of Psychiatry**, v. 156, n. 6, p. 837–841, 1999.
- KENIS, G.; MAES, M. Effects of antidepressants on the production of cytokines. **International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 5, n. 4, p. 401-412, 2002.
- KHATUA, S.; SIMAL-GANDARA, J.; ACHARYA, K. Understanding immune-modulatory efficacy *in vitro*. **Chemico-Biological Interactions**, v. 352, p. 109776, 2022.
- KHUSHBOO, S. B.; SHARMA, B. Antidepressants: mechanism of action, toxicity and possible amelioration. **Journal of Applied Biotechnology and Bioengineering**, v. 3, p. 1-13, 2017.
- KIM, J. J.; HIBBS, R. E. Direct Structural Insights into GABAA Receptor Pharmacology. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 46, n. 6, p. 502–517, 2021.
- KLEPPISCH, T.; FEIL, R. cGMP signalling in the mammalian brain: role in synaptic plasticity and behaviour. **cGMP: Generators, Effectors and Therapeutic Implications**, p. 549-579, 2009.

KNIGHT, P. *et al.* Sex differences in the elevated plus-maze test and large open field test in adult Wistar rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 204, p. 173168, 2021.

KOBZIK, L.; BREDET, D. S.; LOWENSTEIN, C. J.; DRAZEN, J.; GASTON, B.; SUGAR-BAKER, D.; STAMLER, J. S. Nitric oxide synthase in human and rat lung: immunocytochemical and histochemical localization. **American journal of respiratory cell and molecular biology**, v. 9, p. 371-371, 1993.

KRAEUTER, A.-K.; GUEST, P. C.; SARNYAI, Z. The Elevated Plus Maze Test for Measuring Anxiety-Like Behavior in Rodents. **Pre-Clinical Models**, v. 1916, p. 69–74, 2019.

KRAEUTER, A.-K.; GUEST, P. C.; SARNYAI, Z. The Open Field Test for Measuring Locomotor Activity and Anxiety-Like Behavior. **Pre-Clinical Models**, v. 1916, p. 99–103, 2019.

KRISHNADAS, R.; CAVANAGH, J. Depression: An inflammatory illness? **Journal of Neurology Neurosurg. Psychiatry**, v. 83, n.5, p. 595-502, 2012.

KUZMINSKAITE, E. *et al.* Childhood trauma in adult depressive and anxiety disorders: an integrated review on psychological and biological mechanisms in the NESDA cohort. **Journal of affective disorders**, v. 283, p.179-191, 2021.

LADER, M. H. Limitations on the use of benzodiazepines in anxiety and insomnia: Are they justified? **European Neuropsychopharmacology**, v. 9, Sup. 6, p. 399–405, 1999.

LAPCZYNSKI, A. *et al.* Fragrance material review on tetrahydrolinalool. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 11, p. S286–S288, 2008.

LAPCZYNSKI, A. *et al.* Fragrance material review on tetrahydrolinalool. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 11 Sup.11, p. S286–S288, 2008.

LASKOWSKI, M. W. *et al.* PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. **Journal of Applied Crystallography**, v. 26, n. 2, p. 283–291, 1993.

LAU, A.; TYMIANSKI, M. Glutamate receptors, neurotoxicity and neurodegeneration. **Pflügers Archiv-European Journal of Physiology**, v. 460, n. 2, p. 525-542, 2010.

LEE, C.; GIULIANI, F. The role of inflammation in depression and fatigue. **Frontiers in immunology**, v. 10, p. 1696, 2019.

LESCH, K.-P. *et al.* Targeting brain serotonin synthesis: insights into neurodevelopmental disorders with long-term outcomes related to negative emotionality, aggression and antisocial behaviour. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 367, n. 1601, p. 2426–2443, 2012.

LI, Z. *et al.* Mind–Body Exercise for Anxiety and Depression in COPD Patients: A Systematic Review and Meta-Analysis. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 17, n. 1, p. 22, 2019.

LIPINSKI, C. A.; LOMBARDO, F.; DOMINY, B. W.; FEENEY, P. J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and

development settings. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 64, p. 4–17, 2012.

LIRA, A. B. *et al.* Evaluation of Toxicity and Oxidative Stress of 2-Acetylpyridine-N(4)-ortho-chlorophenyl Thiosemicarbazone. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2022, 2022.

LORD, K. A. *et al.* Social criticism moderates the relationship between anxiety and depression 10 years later. **Journal of Affective Disorders**, v. 274, p. 15–22, 2020.

LORIGOOINI, Z. *et al.* Limonene through Attenuation of Neuroinflammation and Nitrite Level Exerts Antidepressant-Like Effect on Mouse Model of Maternal Separation Stress. **Behavioural Neurology**, v. 2021.

LOVELL, S. C. *et al.* Structure validation by C alpha geometry: phi, psi and Cbeta deviation. **Proteins-Structure Function and Genetics**, v. 50, n. 3, p. 437–450, 2003.

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.

MANAYI, A.; NABAVI, S. M.; DAGLIA, M.; JAFARI, S. Natural terpenoids as a promising source for modulation of GABAergic system and treatment of neurological diseases. **Pharmacological Reports**, v. 68, n. 4, p. 671–679, 2016.

MANDELLI, L.; PETRELLI, C.; SERRETTI, A. The role of specific early trauma in adult depression: A meta-analysis of published literature. Childhood trauma and adult depression. **European Psychiatry**, v. 30, n. 6, p. 665–680, 2015.

MARTINS, J.; BRIJESH, S. Phytochemistry and pharmacology of anti-depressant medicinal plants: A review. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 104, p. 343–365, 2018.

MARWOOD, L. *et al.* Meta-analyses of the neural mechanisms and predictors of response to psychotherapy in depression and anxiety. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 95, p. 61–72, dez. 2018.

MATVEYCHUK *et al.* Ketamine as an antidepressant: overview of its mechanisms of action and potential predictive biomarkers. **Therapeutic Advances in Psychopharmacology**, v. 10, 2020.

MAUST, D. T.; LIN, L. A.; BLOW, F. C. Benzodiazepine Use and Misuse Among Adults in the United States. **Psychiatric Services**, v. 70, n. 2, p. 97–106, 2019.

MAZZA, M. G. *et al.* Anxiety and depression in COVID-19 survivors: Role of inflammatory and clinical predictors. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 89, p. 594–600, 2020.

MCGUFFIN, P. *et al.* The Heritability of Bipolar Affective Disorder and the Genetic Relationship to Unipolar Depression. **Archives of General Psychiatry**, v. 60, n. 5, p. 497, 2003.

MCKAY, M.T. *et al.* Childhood trauma and adult mental disorder: A systematic review and

meta-analysis of longitudinal cohort studies. **Acta Psychiatrica Scandinavica**, v. 143, n. 3, p;189-205, 2021.

MCKIN, D. L. *et al.* Anhedonia predicts poorer recovery among youth with selective serotonin reuptake inhibitor treatment-resistant depression. **Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry**, v. 51, n. 4, p. 404–411, 2012.

MEALEY, K. L *et al.* Oral bioavailability of P-glycoprotein substrate drugs do not differ between ABCB1-1Δ and ABCB1 wild type dogs. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 33, n. 5, p. 453–460, 2010.

MICHELI, L. *et al.* Depression and adult neurogenesis: Positive effects of the antidepressant fluoxetine and of physical exercise. **Brain Research Bulletin**, v. 143, p. 181–193, 2018.

MILLER, A. H.; RAISON, C. L. The role of inflammation in depression: from evolutionary imperative to modern treatment target. **Nature Reviews Immunology**, v. 16, n. 1, p. 22–34, 2016.

MOHAMED, A. A.; EL-KADI, A. P-Glycoprotein Effects on Drugs Pharmacokinetics and Drug-Drug- Interactions and Their Clinical Implications. **The Libyan Journal of Pharmacy and Clinical Pharmacology**, v. 1, n. 3, p. 11-12, 2012.

MONTEIRO, A. B. *et al.* Anxiolytic and antidepressant-like effects of *Annona coriacea* (Mart.) and caffeic acid in mice. **Food and Chemical Toxicology**, v. 136, p. 111049, 2020.

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

MORETTI, M. *et al.* Involvement of nitric oxide–cGMP pathway in the antidepressant-like effect of ascorbic acid in the tail suspension test. **Behavioural brain research**, v. 225, n. 1, p. 328-333, 2011.

MORI, T. *et al.* Comparison of the behavioral effects of bupropion and psychostimulants. **European Journal of Pharmacology**, v. 718, n. 1–3, p. 370–375, 2013.

MOURA, D. F. *et al.* Avaliação Ponderal e Screening Hipocrático de Camundongos Tratados com Nerolidol. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n.1, 2020.

MÜLLER, W. E. *et al.* Pharmacological basis of the anxiolytic and antidepressant properties of Silexan®, an essential oil from the flowers of lavender. **Neurochemistry International**, v. 143, 2021.

MURTALA, A. A.; AKINDELE, A. J. Anxiolytic- and antidepressant-like activities of hydroethanol leaf extract of *Newbouldia laevis* (P.Beauv.) Seem. (Bignoniaceae) in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 249, p. 112420, 2020.

NAUTIYAL, K. M.; HEN, R. Serotonin receptors in depression: from A to B. **F1000Research**, v. 6, p. 123, 2017.

NESTLER, E. J.; CARLEZON, W. A. The Mesolimbic Dopamine Reward Circuit in Depression. **Biological Psychiatry**, v. 59, n. 12, p. 1151–1159, 2006.

NEUMANN, I. D. *et al.* Animal models of depression and anxiety: What do they tell us about human condition? **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 35, n. 6, p. 1357–1375, 2011.

JOANNE, N. G. *et al.* Monoamine neurotransmitter disorders—clinical advances and future perspectives. **Nature Reviews Neurology**, v. 11, n. 10, p. 567–584, 2015.

NICIU, M. J. *et al.* Glutamate Receptor Antagonists as Fast-Acting Therapeutic Alternatives for the Treatment of Depression: Ketamine and Other Compounds. **Annu. Rev. Pharmacology & Toxicology**, v. 54, 119–139. 2014.

NIELSEN, J. A. *et al.* E. Effects of acute and chronic bupropion on locomotor activity and dopaminergic neurons. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 24, n. 4, p. 795–799, 1986.

NUNES, E. A.; HALLAK, J. E. C. Modelos animais em psiquiatria: avanços e desafios. **Revista latinoamericana de psicopatologia fundamental**, v. 17, n. 3, 2014.

OCDE GUIDELINE for testing of chemicals: acute oral toxicity: acute toxic class method. [S.l.], 2001. (OECD/OCDE, 423 Adopted: 17th December 2001). Disponível em: <[https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-423-acute-oral-toxicity-acute-toxic-classmethod\\_9789264071001-en](https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-423-acute-oral-toxicity-acute-toxic-classmethod_9789264071001-en)>. Acesso em: 20 mai. 2021.

OKAMOTO, N. *et al.* L-Arginine-Nitric Oxide Pathway and Neural Networks in Major Depression. **Psychiatria Danubina**, v. 34, n. 1, p.102-103, 2022.

OLIVA, V. *et al.* Gastrointestinal side effects associated with antidepressant treatments in patients with major depressive disorder: A systematic review and meta-analysis. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 109, p. 110266, 2021.

OLIVEIRA, M. G. B. *et al.*  $\alpha$ -Terpineol Reduces Mechanical Hypernociception and Inflammatory Response. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 111, n. 2, p. 120-125, 2012.

OLIVIER, J. D. A. *et al.* 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.

OSTROWSKA, K. *et al.* 5-HT<sub>1A</sub> and 5-HT<sub>2A</sub> receptors affinity, docking studies and pharmacological evaluation of a series of 8-acetyl-7-hydroxy-4-methylcoumarin derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 26, n. 2, p. 527–535, 2018.

OTTE, C.; GOLD.; PENNINX, B.; PARIANTE, C.M.; ETKIN, A.; FAVA, M.; MOHR, D.C.; SCHATZBERG, A.F. Major depressive disorder. **Nat Rev Dis Primers**, v. 2, n. 16065, 2016.

PAPP, M. *et al.* Antidepressant, anxiolytic and procognitive effects of subacute and chronic ketamine in the chronic mild stress model of depression. **Behavioural Pharmacology**, v. 28, n. 1, p. 1–8, 2017.

PARTYKA, A *et al.* Antidepressant- and anxiolytic-like activity of 7-phenylpiperazinylalkyl-1,3-dimethyl-purine-2,6-dione derivatives with diversified 5-HT<sub>1A</sub> receptor functional profile. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 23, n. 1, p. 212–221, 2015.

PENNER-GOEKE, S.; BINDER, E. B. Epigenetics and depression. **Dialogues in Clinical Neuroscience**, v. 21, n. 4, p. 397–405, 2019.

PÉREZ-CANO, H. J. *et al.* Anxiety, depression, and stress in response to the coronavirus disease-19 pandemic. **Cirugía y Cirujanos**, v. 88, n. 5, p. 4511, 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.

PINARD, C. R. *et al.* Dopaminergic innervation of interneurons in the rat basolateral amygdala. **Neuroscience**, v. 157, n. 4, p. 850–863, 2008.

PINZI, L.; RASTELLI, G. Molecular Docking: Shifting Paradigms in Drug Discovery. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 18, p. 4331, 2019.

PIRES, D. E. V.; BLUNDELL, T. L.; ASCHER, D. B. pkCSM: Predicting small-molecule pharmacokinetic and toxicity properties using graph-based signatures. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 58, n. 9, p. 4066–4072, 2015a.

PIRES, D. E. V.; BLUNDELL, T. L.; ASCHER, D. B. pkCSM : predicting small-molecule pharmacokinetic properties using graph-based signatures (Theory- How to Enterpret pkCSM Result). **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 58, n. 9, p. 4066-4072, 2015.

PITSIKAS, N. The role of nitric oxide (NO) donors in anxiety. Lights and shadows. **Nitric Oxide**, v. 77, p. 6-11, 2018.

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, nov. 2019.

POSTAL *et al.* Depressive symptoms are associated with tumor necrosis factor alpha in systemic lupus erythematosus. **J. Neuroinflammation**, v. 13, n.1, 2016.

POSTAL, M.; APPENZELLER, S. The role of tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ) in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. **Cytokine**, v. 56, n. 3, p. 537-543, 2011.

POURHAMZEH, M. *et al.* The Roles of Serotonin in Neuropsychiatric Disorders. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 42, n. 6, p. 1671–1692, ago. 2022.

POURTAGI *et al.* Effect of linalool on the acquisition and reinstatement of morphine-induced conditioned place preference in mice. **Avicenna Journal of Phytomedicine**, v. 7, n. 3, p. 242-249, 2017.

PREVOT, T. D. *et al.* Novel Benzodiazepine-Like Ligands with Various Anxiolytic, Antidepressant, or Pro-Cognitive Profiles. **Molecular Neuropsychiatry**, v. 5, n. 2, p. 84–97, 2019.

PRUT, L.; BELZUNG, C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: A review. **European Journal of Pharmacology**, v. 463, n. 1–3, p. 3–33, 2003.

RADI, R.; BECKMAN, J. S.; BUSH, K. M.; FREEMAN, B. A. Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 288, n. 2, p. 481-487, 1991.

RAFAŁO-ULIŃSKA, A.; BRAŃSKI, P.; PAŁUCHA-PONIEWIERA, A. Combined Administration of (*R*)-Ketamine and the mGlu2/3 Receptor Antagonist LY341495 Induces Rapid and Sustained Effects in the CUMS Model of Depression via a TrkB/BDNF-Dependent Mechanism. **Pharmaceuticals**, v. 21, n. 15, p. 125, 2022.

RAUHUT, A. S.; HAWRYLAK, M.; MARDEKIAN, S. K. Bupropion differentially alters the aversive, locomotor and rewarding properties of nicotine in CD-1 mice. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 90, n. 4, p. 598–607, 2008.

REIERSON, G. W. *et al.* cGMP signaling, phosphodiesterases and major depressive disorder. **Current Neuropharmacology**, v. 9, n. 4, p. 715-727, 2011.

RICHARDSON-JONES, J. W. *et al.* Serotonin-1A Autoreceptors Are Necessary and Sufficient for the Normal Formation of Circuits Underlying Innate Anxiety. **The Journal of Neuroscience**, v. 31, n. 16, p. 6008–6018, 2011.

RIOS, M. Y. *et al.* Glaucaetalin E and galphimidin B from *Galphimia glauca* and their anxiolytic activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 259, p. 112939, 2020.

RIZVI, S.; PIZZAGALLI, D. A.; SPROULE, B. A.; KENNEDY, S. H. Assessing anhedonia in depression: Potentials and pitfalls. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 65, p. 21–35, 2016.

ROCHA-PEREIRA, C. *et al.* Histological and toxicological evaluation, in rat, of a P-glycoprotein inducer and activator: 1-(propan-2-ylamino)-4-propoxy-9H-thioxanthen-9-one (TX5). **Experimental and Clinical Sciences**, v. 18, p. 697-722, 2019.

RODRIGUES, K. A. F.; SILVA, D. K. F.; SERAFIM, V. L.; ANDRADE, P. N.; ALVES, A. F.; TAFURI, W. L.; BATISTA, T. M.; MANGUEIRA, V. M.; SOBRAL, M. V.; MOURA, R. O.; JUNIOR, F. J. B. M.; DE OLIVEIRA, M. R. SB-83, a 2-Amino-thiophene derivative orally bioavailable candidate for the leishmaniasis treatment. **Biomedicine & Pharmacotherapy**. 2018.

ROMBOLÀ, L. *et al.* Role of 5-HT<sub>1A</sub> Receptor in the Anxiolytic-Relaxant Effects of Bergamot Essential Oil in Rodent. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 7, p. 2597, 2020.

ROPER, A. *et al.* A Systematic Review of Psychotherapy Approaches for Anxiety in Parkinson's Disease. **Clinical gerontologist**, p. 1–27, 2022.

ROSA-ALCÁZAR, Á. *et al.* Cognitive-Behavioral Therapy and Anxiety and Depression Level in Pediatric Obsessive-Compulsive Disorder: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Psicothema**, v. 34, n. 3, p. 353-364, 2022.

ROSENKRANZ, M. *et al.* Volatile terpenes – mediators of plant-to-plant communication. **The Plant Journal**, v. 108, n. 3, p. 617–631, 2021.

RUIZ, P.; CALLIARI, A.; PAUTASSI, R. M. Reserpine-induced depression is associated in female, but not in male, adolescent rats with heightened, fluoxetine-sensitive, ethanol consumption. **Behavioural Brain Research**, v. 348, p. 160–170, 2018.

SAHLE, B. W. *et al.* Association between depression, anxiety and weight change in young adults. **BMC Psychiatry**, v. 19, n. 1, p. 398, 2019.

SALIM, S.; CHUGH, G.; ASGHAR, M. Inflammation in anxiety. **Advances in protein chemistry and structural biology**, v. 88, p. 1-25, 2012.

SANTOS, P. L. *et al.* Citronellol, a monoterpene alcohol with promising pharmacological activities - A systematic review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 123, p. 459-469, 2019.

SANTOS, P. L. *et al.* Citronellol, a monoterpene alcohol with promising pharmacological activities - A systematic review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 123, p. 459-469, 2019.

SARTORE, D. P. *et al.* Involvement of monoaminergic targets in the antidepressant- and anxiolytic-like effects of the synthetic alkamide riparin IV: Elucidation of further mechanisms through pharmacological, neurochemistry and computational approaches. **Behavioral Brain Research**, v. 383, n. 6, p. 112487, 2020.

SCHRAMMEN, E.; ROESMANN, K.; ROSENBAUM, D.; REDLICH, R.; HARENBROCK, J.; DANNLOWSKI, U.; LEEHR, E. J. Functional neural changes associated with psychotherapy in anxiety disorders - A meta-analysis of longitudinal fMRI studies. **Neuroscience Biobehaviour Rev**, 2022.

SHELTON, R. C. Serotonin and Norepinephrine Reuptake Inhibitors. Antidepressants. **Cham: Springer International Publishing**. v. 250, p. 145–180. 2018.

SHEN, M. Y. F. *et al.* Rapid anti-depressant and anxiolytic actions following dopamine D<sub>1</sub>-D<sub>2</sub> receptor heteromer inactivation. **European Neuropsychopharmacology**, v. 25, n. 12, p. 2437–2448, dez. 2015.

SILVA, P. R. *et al.* (E)-2-Cyano-3-(1H-Indol-3-yl)-N-phenylacrylamide, a hybrid compound derived from indomethacin and paracetamol: Design, synthesis and evaluation of the anti-inflammatory potential. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 7, p. 1–17, 2020.

SINGH, P.; WALIA, V. Anxiolytic like effect of L-Carnitine in mice: Evidences for the involvement of NO-sGC-cGMP signaling pathway. **Behavioural brain research**, v. 391, p. 112689, 2020.

SONG, J.; KIM, Y. Animal models for the study of depressive disorder. **CNS Neuroscience & Therapeutics**, v. 27, n. 6, p. 633–642, 2021.

SOUTO-MAIOR, F. N. et al. Antinociceptive and anticonvulsant effects of the monoterpene linalool oxide. **Pharmaceutical Biology**, v. 55, n. 1, p. 63–67, 2017.

SPIACCI, A. *et al.* 5-HT<sub>1A</sub> receptors of the rat dorsal raphe lateral wings and dorsomedial subnuclei differentially control anxiety- and panic-related defensive responses. **Neuropharmacology**, v. 107, p. 471–479, 2016.

STANZIONE, F.; GIANGRECO, I.; COLE, J. C. Use of molecular docking computational tools in drug discovery. **Progress in Medicinal Chemistry**, vol. 60, p. 273-343. 2021.

STASHENKO, E. E. Review Sampling flower scent for chromatographic analysis. **Journal of Separation Science**, v.31, n. 11, p. 2022-2031, 2008.

SZUHANY, K. L.; SIMON, N. M. Anxiety Disorders: A Review. **JAMA**, v. 328, n. 24, p. 2431, 2022.

THIBAUT, F. Anxiety disorders: a review of current literature. **Dialogues in Clinical Neuroscience**, v. 19, n. 2, 2017.

TRIPOSKIADIS, F. *et al.* The Sympathetic Nervous System in Heart Failure. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 54, n. 19, p. 1747–1762, 2009.

TURAN-KAVRADIM, S.; YANGÖZ Ş, T.; OZER, Z. Effectiveness of aromatherapy inhalation on anxiety and haemodynamic variables for patients with cardiovascular disease: A systematic review and meta-analysis. **International Journal of Clinical Practice**, v. 75, n.11, e. 14593, 2021.

UHER, R *et al.* Depression symptom dimensions as predictors of antidepressant treatment outcome: Replicable evidence for interest-activity symptoms. **Psychological Medicine**, v. 42, n. 5, p. 967–980, 2012.

UMEZU, T.; NAGANO, K.; ITO, H.; KOSAKAI, K.; SAJANIA, M.; MORITA, M. Anticonflict effects of lavender oil and identification of its active constituents. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 85, n. 4, p. 713–721, 2006.

VAN POELGEEST, E. P. *et al.* Depression, antidepressants and fall risk: therapeutic dilemmas—a clinical review. **European Geriatric Medicine**, v. 12, n. 3, p. 585–596, 2021.

VOGELZANGS, N. *et al.* Cytokine production capacity in depression and anxiety. **Transl. Psychiatry**, v. 6, n.5, p. e825, 2016.

WACKER, D. *et al.* Structural Features for Functional Selectivity at Serotonin Receptors. **Science**, v. 340, n. 6132, p. 615–619, 2013.

WANG, H.-Q.; WANG, Z.-Z.; CHEN, N.-H. The receptor hypothesis and the pathogenesis of depression: Genetic bases and biological correlates. **Pharmacological Research**, v. 167, p. 105542, 2021.

WANG, Y. *et al.* *In Silico* Prediction of Human Intravenous Pharmacokinetic Parameters with Improved Accuracy. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 59, n. 9, p. 3968–3980, 2019.

WATERHOUSE, A. *et al.* SWISS-MODEL: Homology modelling of protein structures and complexes. **Nucleic Acids Research**, v. 46, n. 1, p. W296–W303, 2018.

WILLE, A.; AMORT, T.; SINGEWALD, N.; SARTORI, S. B.; LUSSER, A. Dysregulation of select ATP-dependent chromatin remodeling factors in high trait anxiety. **Behavioural Brain Research**, v. 311, p. 141–146, 2016.

WILLIAMSON, J. B.; JAFFEE, M. S.; JORGE, R. E. Posttraumatic Stress Disorder and Anxiety-Related Conditions. **CONTINUUM: Lifelong Learning in Neurology**, v. 27, n. 6, p. 1738–1763, 2021.

WU, Z.; FANG, Y. Comorbidity of depressive and anxiety disorders : challenges in diagnosis and assessment. **Shanghai Archives Psychiatry**, v. 26, n. 4, p. 227–231, 2014.

YANG, W. *et al.* The Evolving Drug ability and Developability Space: Chemically Modified New Modalities and Emerging Small Molecules. **The AAPS journal**, v. 22, p. 21, 2020.

YAZIR, Y., UTKAN, T., ARICIOGLU, F. Inhibition of neuronal nitric oxide synthase and soluble guanylate cyclase prevents depression-like behaviour in rats exposed to chronic unpredictable mild stress. **Basic & clinical pharmacology & toxicology**, v. 111, n. 3, p. 154-160, 2012.

YUEN, E.; SWANSON, S.; WITKIN, J. M. Prediction of human efficacious antidepressant doses using the mouse forced swim test. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 161, n. September, p. 22–29, 2017.

YUN, J. Limonene inhibits methamphetamine-induced locomotor activity via regulation of 5-HT neuronal function and dopamine release. **Phytomedicine**, v. 21, n. 6, p. 883–887, 2014.

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.

ZEMESTANI, M.; FAZELI NIKOO, Z. Effectiveness of mindfulness-based cognitive therapy for comorbid depression and anxiety in pregnancy: a randomized controlled trial. **Archives of Women's Mental Health**, v. 23, n. 2, p. 207–214, 2020.

ZHANG, A. *et al.* Cognitive behavioral therapy for primary care depression and anxiety: a secondary meta-analytic review using robust variance estimation in meta-regression. **Journal of Behavioral Medicine**, v. 42, n. 6, p. 1117–1141, 2019.

ZHANG, Y. *et al.* Natural volatile oils derived from herbal medicines: A promising therapy way for treating depressive disorder. **Pharmacological Research**, v. 164, p. 105376, 2021.

ZHOU, Y.; CAO, Z.; DU, Y. Comorbid generalized anxiety disorder and its association with quality of life in patients with major depressive disorder. **Scientific Reports**, v. 7, n. 7, p. 1–8, 2017.

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, e.0197267, 2018.

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

ZORUMSKI, C. F.; IZUMI, Y.; MENNERICK, S. Ketamine: NMDA Receptors and Beyond. **Journal of Neuroscience**, v. 36, 11158–11164. 2016.

## ANEXO A – Comitê de Ética em Uso de Animais (CEUA) nº6479250620



Universidade  
Federal da  
Paraíba

Comissão de Ética no  
Uso de Animais

Biotética



### CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação do efeito ansiolítico e antidepressivo símile de um derivado terpênico em modelos animais", protocolada sob o CEUA nº 6479250620 (ID 002106), sob a responsabilidade de **Reinaldo Nóbrega de Almeida** e equipe; **Pablo Rayff da Silva** - 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 07/08/2020.

We certify that the proposal "Evaluation of the anxiolytic and antidepressant-like effect of a terpenic derivative in animal models.", utilizing 353 Heterogenics mice (353 males), protocol number CEUA 6479250620 (ID 002106), under the responsibility of **Reinaldo Nóbrega de Almeida** and team; **Pablo Rayff da Silva** - 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 08/07/2020.

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

Vigência da Proposta: de 08/2020 a 03/2024

Área: **Fisiologia E Patologia**

Origem: **Unidade de Produção Animal IPeFarM**

Espécie: **Camundongos heterogênicos**

sexo: **Machos**

idade: **3 a 4 meses**

N: **353**

Linhagem: **Mus musculus - Swiss**

Peso: **20 a 40 g**

Local do experimento: **Laboratório de Psicofarmacologia/IpeFarM/UFPB.**

João Pessoa, 08 de agosto de 2020

Profa. Dra. Jailane de Souza Aquino  
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal da Paraíba

Prof. Dr. Carlos Augusto Alanis Clemente  
Vice-Coodenador da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal da Paraíba

## ANEXO B – Protocolo Triagem Comportamental

Atividade farmacológica	Quantificação dos efeitos (0) sem efeito, (-) efeito diminuído, (+) efeito presente, (++) efeito intenso				
	Até 30'	1 h	2 h	3 h	4 h
<b>1 – SNC</b>					
<b>a – Estimulante</b>					
Hiperatividade					
Irritabilidade					
Agressividade					
Tremores					
Convulsões					
Piloereção					
Movimento intenso das vibrissas					
<b>Outras</b>					
<b>b – Depressora</b>					
Hipnose					
Ptose					
Sedação					
Anestesia					
Ataxia					
Reflexo do endireitamento					
Catatonía					
Analgesia					
Resposta ao toque diminuído					
Perda do reflexo corneal					
Perda do reflexo auricular					
<b>c – Outros comportamentos</b>					
Ambulação					
Bocejo excessivo					
Limpeza					
Levantar					
Escalar					
Vocalizar					
Sacudir a cabeça					
Contorções abdominais					
Abdução das patas do trem posterior					
Pedalar					
Estereotípia					
<b>2 - SN AUTÔNOMO</b>					
Diarreia					
Constipação					
Defecação aumentada					
Respiração forçada					
Lacrimejamento					
Cianose					
Tono muscular					
Força para agarrar					
<b>3 – MORTE</b>					

Fonte: Almeida et al. (1999).

**Artigo 1 (Relacionado à tese).** Rayff da Silva P, Diniz Nunes Pazos N, Karla Silva do Nascimento Gonzaga T, Cabral de Andrade J, Brito Monteiro Á, Caroline Ribeiro Portela A, Fernandes Oliveira Pires H, Dos Santos Maia M, Vilar da Fonsêca D, T Scotti M, Maria Barbosa Filho J, Pergentino de Sousa D, Francisco Bezerra Felipe C, Nóbrega de Almeida R, Scotti L. Anxiolytic and Antidepressant-like Effects of Monoterpene Tetrahydrolinalool and *In silico* Approach of new Potential Targets. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, v. 18, p. 1530-1552, 2022. Link de acesso: <https://www.eurekaselect.com/article/123147>. **Qualis A2 – ISSN: 1873-4294.**

1530

Send Orders for Reprints to [reprints@benthamscience.net](mailto:reprints@benthamscience.net)*Current Topics in Medicinal Chemistry*, 2022, 22, 1530-1552

## RESEARCH ARTICLE



### Anxiolytic and Antidepressant-like Effects of Monoterpene Tetrahydrolinalool and *In silico* Approach of new Potential Targets



Pablo Rayff da Silva<sup>1</sup>, Natalia Diniz Nunes Pazos<sup>1</sup>, Thallita Karla Silva do Nascimento Gonzaga<sup>1</sup>, Jéssica Cabral de Andrade<sup>1</sup>, Álefe Brito Monteiro<sup>1</sup>, Anne Caroline Ribeiro Portela<sup>1</sup>, Hugo Fernandes Oliveira Pires<sup>1</sup>, Mayara dos Santos Maia<sup>2</sup>, Diogo Vilar da Fonsêca<sup>3</sup>, Marcus T. Scotti<sup>2</sup>, José Maria Barbosa Filho<sup>4</sup>, Damião Pergentino de Sousa<sup>4</sup>, Cicero Francisco Bezerra Felipe<sup>1</sup>, Reinaldo Nóbrega de Almeida<sup>1</sup> and Luciana Scotti<sup>2,\*</sup>

<sup>1</sup>Psychopharmacology Laboratory, Institute of Drugs and Medicines Research, Federal University of Paraíba, 58051-085, Via Ipê Amarelo, S/N, João Pessoa, Paraíba, Brazil; <sup>2</sup>Cheminformatics Laboratory, Institute of Drugs and Medicines Research, Federal University of Paraíba, 58051-900, Via Ipê Amarelo, S/N, João Pessoa, Paraíba, Brazil; <sup>3</sup>Collegiate of Medicine, Federal University of São Francisco Valley, 48607-190, Rua Aurora, S/N, Bahia, Brazil; <sup>4</sup>Pharmaceutical Chemistry Laboratory, Department of Pharmaceutical Sciences, Federal University of Paraíba, 58051-900, Via Ipê Amarelo, S/N, João Pessoa, Brazil

**Abstract: Introduction:** Although drugs currently available for the treatment of anxiety and depression act through modulation of the neurotransmission systems involved in the neurobiology of the disorder, yet they often present side effects, which can impair patient adherence to treatment.

**Methods:** This has driven the search for new molecules with anxiolytic and antidepressant potential. Aromatic plants are rich in essential oils, and their chemical constituents, such as monoterpenes, are being studied for these disorders. This study aims to evaluate the anxiolytic and antidepressant-like potential of the monoterpene tetrahydrolinalool in *in vivo* animal models and review pharmacological targets with validation through molecular docking. Male Swiss mice (*Mus musculus*) were treated with THL (37.5-600 mg kg<sup>-1</sup> p.o.) and submitted to the elevated plus maze, open field, rotarod, and forced swim tests. In the elevated plus-maze, THL at doses of 37.5 and 75 mg kg<sup>-1</sup> induced a significant increase in the percentage of entries (72.7 and 64.3% respectively), and lengths of stay (80.3 and 76.8% respectively) in the open arms tests.

**Results:** These doses did not compromise locomotor activity or motor coordination in the animals. In the open field, rotarod tests, and the forced swimming model, treatment with THL significantly reduced immobility times at doses of 150, 300, and 600 mg kg<sup>-1</sup>, and by respective percentages of 69.3, 60.9 and 68.7%.

**Conclusion:** In molecular docking assay, which investigated potential targets, THL presented satisfactory energy values for: nNOs, SGC, IL-6, 5-HT<sub>1A</sub>, NMDAr, and D1. These demonstrate the potential of THL (a derivative of natural origin) in *in vivo* and *in silico* models, making it a drug candidate.

## ARTICLE HISTORY

Received: December 01, 2021  
Revised: February 03, 2022  
Accepted: February 16, 2022

DOI:  
10.2174/1568026622666220505104726



**Keywords:** Tetrahydrolinalool, Natural products, Anxiety, Depression, Docking, Chemoinformatics.

## 1. INTRODUCTION

According to the World Health Organization, it is estimated that 28.8% and 16.6% of the population will respectively present either anxiety or depression during their lives. In 40-75% of cases, these disorders may appear in association with each other [1]. Patients presenting both anxiety

and depression are typically less productive, making these diseases a principal cause of psychosocial disability. This is due to episodic aggravations, longer crises periods, accentuated symptoms, standard treatment refractoriness and ineffectiveness [2, 3]. Pharmacological therapy for anxiety generally involves the use of benzodiazepines, azapirone (buspirone), and antidepressant medications, among others. To treat depression, drugs from the class of tricyclics (TCAs), monoamine oxidase inhibitors (iMAOs), selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs), serotonin-noradrenaline reuptake inhibitors (SNRIs), or atypical antidepressants are used.

\*Address correspondence to this author at the Cheminformatics Laboratory, Institute of Drugs and Medicines Research, Federal University of Paraíba, 58051-900, Via Ipê Amarelo, S/N, João Pessoa, Paraíba, Brazil; E-mail: [luciana.scotti@gmail.com](mailto:luciana.scotti@gmail.com)

**Artigo 2.** da Silva PR, de Andrade JC, de Sousa NF, Ribeiro Portela AC, Oliveira Pires HF, Bezerra Remígio MCR, Alves DDN, de Andrade HHN, Dias AL, da Silva Stiebbe Salvadori MG, de Oliveira Golzio AMF, de Castro RD, Scotti MT, Bezerra Felipe CF, de Almeida RN, Scotti L. Computational Studies Applied to Linalool and Citronellal Derivatives Against Alzheimer's and Parkinson's Disorders: A Review with Experimental Approach. *Current Neuropharmacology*, v. 21, n. 4. p. 842-866, 2023. Link de acesso: <https://www.eurekaselect.com/article/129656>- **Qualis A1** – **ISSN: 1875-6190**.

<https://www.eurekaselect.com/article/129656#>

Send Orders for Reprints to [reprints@benthamscience.net](mailto:reprints@benthamscience.net)

*Current Neuropharmacology*, XXXX, XX, XX-XX 1

REVIEW ARTICLE

**Computational Studies Applied to Linalool and Citronellal Derivatives Against Alzheimer's and Parkinson's Disorders: A Review with Experimental Approach**

Pablo Rayff da Silva<sup>1</sup>, Jéssica Cabral de Andrade<sup>1</sup>, Natália Ferreira de Sousa<sup>2</sup>, Anne Caroline Ribeiro Portela<sup>1</sup>, Hugo Fernandes Oliveira Pires<sup>1</sup>, Maria Caroline Rodrigues Bezerra Remígio<sup>1</sup>, Danielle da Nóbrega Alves<sup>1</sup>, Humberto Hugo Nunes de Andrade<sup>1</sup>, Arthur Lins Dias<sup>1</sup>, Mirian Graciela da Silva Stiebbe Salvadori<sup>1</sup>, Adriana Maria Fernandes de Oliveira Golzio<sup>1</sup>, Ricardo Dias de Castro<sup>1</sup>, Marcus T. Scotti<sup>1</sup>, Cicero Francisco Bezerra Felipe<sup>1</sup>, Reinaldo Nóbrega de Almeida<sup>1</sup> and Luciana Scotti<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Psychopharmacology Laboratory, Institute of Drugs and Medicines Research, Federal University of Paraíba, 58051-085, Via Ipê Amarelo, S/N, João Pessoa, Paraíba, Brazil; <sup>2</sup>Cheminformatics Laboratory, Institute of Drugs and Medicines Research, Federal University of Paraíba, 58051-900, Via Ipê Amarelo, S/N, João Pessoa, Paraíba, Brazil

**Abstract:** **Introduction:** Alzheimer's and Parkinson's are neurodegenerative disorders that affect a great number of people around the world, seriously compromising the quality of life of individuals, due to motor and cognitive damage. In these diseases, pharmacological treatment is used only to alleviate symptoms. This emphasizes the need to discover alternative molecules for use in prevention.

**Objective:** Using Molecular Docking, this review aimed to evaluate the anti-Alzheimer's and anti-Parkinson's activity of linalool and citronellal, as well as their derivatives.

**Methodology:** Before performing Molecular Docking simulations, the compounds' pharmacokinetic characteristics were evaluated. For Molecular Docking, 7 chemical compounds derived from citronellal, and 10 compounds derived from linalool, and molecular targets involved in Alzheimer's and Parkinson's pathophysiology were selected.

**Results:** According to the Lipinski rules, the compounds under study presented good oral absorption and bioavailability. For toxicity, some tissue irritability was observed. For Parkinson-related targets, the citronellal and linalool derived compounds revealed excellent energetic affinity for  $\alpha$ -Synuclein, Adenosine Receptors, Monoamine Oxidase (MAO), and Dopamine D<sub>2</sub> receptor proteins. For Alzheimer disease targets, only linalool and its derivatives presented promise against BACE enzyme activity.

**Conclusion:** The compounds studied presented high probability of modulatory activity against the disease targets under study, and are potential candidates for future drugs.

**Keywords:** Neuroprotection, monoterpenes, natural products, neurodegeneration, molecular docking, Alzheimer's disease, Parkinson's disease.

1. INTRODUCTION

Neurodegenerative diseases (NDD) affect a large number of individuals worldwide. These disorders result from the progressive neuronal loss, and affect important brain regions, causing neurophysiological changes with direct impacts on motor and cognitive mechanisms [1]. The etiological basis of these diseases is multifactorial. In addition to the expression

of specific genes responsible for NDD, exposure to environmental agents also influences the extent and severity of the resulting neurodegenerative processes [1-4].

The pathophysiological mechanisms that culminate in programmed cell death over time are due to molecular changes in protein dynamics, and dysfunctions in the ubiquitin-proteasome-autophagy system, with exacerbation of oxidative and neuroinflammatory processes [5].

Neurodegeneration in Alzheimer's disease begins with proteolytic cleavage of amyloid precursor protein (APP), and results in the production, aggregation, and deposition of  $\beta$ -

\*Address correspondence to this author at the Cheminformatics Laboratory, Institute of Drugs and Medicines Research, Federal University of Paraíba, 58051-900, Via Ipê Amarelo, S/N, João Pessoa, Paraíba, Brazil; Tel: 5583996245075; E-mail: Luciana.scotti@gmail.com

**Artigo 3 (Artigo Relacionado à disciplina obrigatória – canalopatias) . da Silva PR, do Nascimento Gonzaga TKS, Maia RE, da Silva BA. Ionic Channels as Potential Targets for the Treatment of Autism Spectrum Disorder: A Review. Curr Neuropharmacol. 2022;20(10):1834-1849. Link de acesso: <https://www.eurekaselect.com/article/117176>. - **Qualis A1** – ISSN: 1875-6190.**

1834

Send Orders for Reprints to [reprints@benthamscience.net](mailto:reprints@benthamscience.net)

Current Neuropharmacology, 2022, 20, 1834-1849

REVIEW ARTICLE



## Ionic Channels as Potential Targets for the Treatment of Autism Spectrum Disorder: A Review



Pablo Rayff da Silva<sup>1</sup>, Thallita Karla Silva do Nascimento Gonzaga<sup>1</sup>, Rayana Elias Maia<sup>2</sup> and Bagnólia Araújo da Silva<sup>1,3,\*</sup>

<sup>1</sup>Postgraduate Program in Natural Synthetic and Bioactive Products, Health Sciences Center, Federal University of Paraíba - Campus I, 58051-085, Via Ipê Amarelo, S/N, João Pessoa, Paraíba, Brazil; <sup>2</sup>Department of Paediatrics and Genetics, Medical Science Center, Federal University of Paraíba - Campus I, 58051-900, Via Ipê Amarelo, S/N, João Pessoa, Paraíba, Brazil; <sup>3</sup>Department of Pharmaceutical Sciences, Health Sciences Center, Federal University of Paraíba - Campus I, 58051-900, Via Ipê Amarelo, S/N, João Pessoa, Paraíba, Brazil

### ARTICLE HISTORY

Received: March 08, 2021  
Revised: June 23, 2021  
Accepted: July 24, 2021

DOI:  
10.2174/1570159X19566210809102547



**Abstract:** Autism spectrum disorder (ASD) is a neurological condition that directly affects brain functions and can culminate in delayed intellectual development, problems in verbal communication, difficulties in social interaction, and stereotyped behaviors. Its etiology reveals a genetic basis that can be strongly influenced by socio-environmental factors. Ion channels controlled by ligand voltage-activated calcium, sodium, and potassium channels may play important roles in modulating sensory and cognitive responses, and their dysfunctions may be closely associated with neurodevelopmental disorders such as ASD. This is due to ionic flow, which is of paramount importance to maintaining physiological conditions in the central nervous system and triggers action potentials, gene expression, and cell signaling. However, since ASD is a multifactorial disease, treatment is directed only to secondary symptoms. Therefore, this research aims to gather evidence concerning the principal pathophysiological mechanisms involving ion channels in order to recognize their importance as therapeutic targets for the treatment of central and secondary ASD symptoms.

**Keywords:** Channelopathies, ion channels controlled by ligands, ion channels controlled by voltage, neurodevelopmental disorders, autism, spectrum disorder, brain function.

### 1. INTRODUCTION

In 1980, Autistic spectrum disorder (ASD) was finally inserted into the Diagnostic and Statistics Manual for Mental Disorders III (DSM-III), yet ASD had been discovered about 70 years earlier [1]. ASD is characterized by varying degrees of impairment in language and social interactions and by the presentation of repetitive behaviors, as well as impairment in adapting to new activities in the routine of the affected individual [2]. In autistic individuals, evidence points to the development of abnormal cytoarchitecture in the first or second trimester of pregnancy, in which increased cell proliferation, abnormal cell migration, and reduced neuronal size and neurochemical alterations are observed [2]. Studies involving magnetic resonance imaging in children aged 18 months to 5 years diagnosed with ASD revealed a 5-10% increase in brain volume, with morphometric changes in the frontal and temporal lobes, and lower gray matter, and amygdala volumes when compared to the healthy control group [3]. It is known that brain volume increases during early childhood,

followed by interrupted growth with possible decreases after 15 years of age [3]. One of the important areas in ASD development is the hippocampus, an area of the limbic system involved in the central functions of social behavior, learning and memory, processes that are compromised in the autistic individual [4-6].

Since the 1980s, in *post mortem* studies, hippocampus neuropathology has been studied, and cellular alterations in subiculum and CA1 have been evidenced. Therefore recent studies indicate that the hippocampus can be a potential biomarker, although not specific for the disorder [6].

All of these changes culminate in atypical brain connectivity, with disruption of neural communication, as well as imbalances in excitation and inhibition mechanisms [7]. Studies indicate that the development of ASD is influenced by environmental factors, such as advanced maternal and/or paternal age, smoking, mothers with hypertension, epilepsy or diabetes, as well as genetic factors, including mutations of the SHANK2 gene, involved in neuronal synapses, changes in the fragile X mental retardation 1 (FMR1) gene, or those associated with channelopathy pathogenesis that results in a phenotype associated with cognitive and neurobehavioral disorders [8-10]. Given this, our review aims to briefly evaluate the latest studies on ion channel mutation and its role in

\*Address correspondence to this author at the Postgraduate Program in Natural Synthetic and Bioactive Products, Health Sciences Center, Federal University of Paraíba - Campus I, 58051-085, Via Ipê Amarelo, S/N, João Pessoa, Paraíba, Brazil; Tel: ++55-83-99352-5595; E-mail: [bagnolia@lff.ufpb.br](mailto:bagnolia@lff.ufpb.br)

1875-6190/22 \$65.00+.00

© 2022 Bentham Science Publishers

**Artigo 4 (Colaborações).** Maia MDS, Mendonça-Junior FJB, Rodrigues GCS, Silva ASD, Oliveira NIP, Silva PRD, Felipe CFB, Gurgel APAD, Nayarisseri A, Scotti MT, Scotti L. Virtual Screening of Different Subclasses of Lignans with Anticancer Potential and Based on Genetic Profile. *Molecules*. 2023 Aug 11;28(16):6011. doi: 10.3390/molecules28166011. PMID: 37630263; PMCID: PMC10459202. Link de acesso: <https://www.mdpi.com/1420-3049/28/16/6011>. **Qualis A2– ISSN: 1420-3049.**



Article

## Virtual Screening of Different Subclasses of Lignans with Anticancer Potential and Based on Genetic Profile

Mayara dos Santos Maia <sup>1</sup>, Francisco Jaime Bezerra Mendonça-Junior <sup>2,3,\*</sup>,  
Gabriela Cristina Soares Rodrigues <sup>4</sup>, Adriano Soares da Silva <sup>5</sup>, Niara Isis Pereira de Oliveira <sup>5</sup>,  
Pablo Rayff da Silva <sup>3</sup>, Cícero Francisco Bezerra Felipe <sup>3</sup>, Ana Pavla Almeida Diniz Gurgel <sup>6</sup>,  
Anuraj Nayarisseri <sup>7</sup>, Marcus Tullius Scotti <sup>3,8</sup> and Luciana Scotti <sup>3,8</sup>

<sup>1</sup> Department of Molecular Biology, Federal University of Paraíba, João Pessoa 58051-900, PB, Brazil; mayarasm@tf.ufpb.br

<sup>2</sup> Laboratory of Synthesis and Drug Delivery, State University of Paraíba, João Pessoa 58071-160, PB, Brazil

<sup>3</sup> Postgraduate Program in Natural Synthetic and Bioactive Products (PgPNSB), Federal University of Paraíba, João Pessoa 58033-455, PB, Brazil; pablo-rayff@hotmail.com (P.R.d.S.); cicero@dbm.ufpb.br (C.F.B.F.); luciana.scotti@gmail.com (M.T.S.); mscotti@gmail.com (L.S.)

<sup>4</sup> Miriri Foods and Bioenergy S/A, Santa Rita 58300-970, PB, Brazil; gaby.ecologia@gmail.com

<sup>5</sup> Program in Ecology and Environmental Monitoring, Federal University of Paraíba, João Pessoa 58059-900, PB, Brazil; adriano.soares05071997@gmail.com (A.S.d.S.); naira.isis.ni@gmail.com (N.I.P.d.O.)

<sup>6</sup> Program in Cellular and Molecular Biology, Federal University of Paraíba, João Pessoa 58051-900, PB, Brazil; ana.pavla@academico.ufpb.br

<sup>7</sup> In Silico Research Laboratory, Eminent Bioscience, Indore 452010, Madhya Pradesh, India; anuraj@eminentbio.com

<sup>8</sup> Laboratory of Cheminformatics, Health Sciences Center, Federal University of Paraíba, João Pessoa 58033-455, PB, Brazil

\* Correspondence: franciscojaime@servidor.uepb.edu.br



**Citation:** Maia, M.d.S.; Mendonça-Junior, F.J.B.; Rodrigues, G.C.S.; Silva, A.S.d.; Oliveira, N.I.P.d.; Silva, P.R.d.; Felipe, C.F.B.; Gurgel, A.P.A.D.; Nayarisseri, A.; Scotti, M.T.; et al. Virtual Screening of Different Subclasses of Lignans with Anticancer Potential and Based on Genetic Profile. *Molecules* **2023**, *28*, 6011. <https://doi.org/10.3390/molecules28166011>

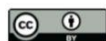
Academic Editor: Bruno Botta

Received: 25 June 2023

Revised: 26 July 2023

Accepted: 4 August 2023

Published: 11 August 2023



**Copyright:** © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Abstract:** Cancer is a multifactorial disease that continues to increase. Lignans are known to be important anticancer agents. However, due to the structural diversity of lignans, it is difficult to associate anticancer activity with a particular subclass. Therefore, the present study sought to evaluate the association of lignan subclasses with antitumor activity, considering the genetic profile of the variants of the selected targets. To do so, predictive models were built against the targets tyrosine-protein kinase ABL (ABL), epidermal growth factor receptor erbB1 (EGFR), histone deacetylase (HDAC), serine/threonine-protein kinase mTOR (mTOR) and poly [ADP-ribose] polymerase-1 (PARP1). Then, single nucleotide polymorphisms were mapped, target mutations were designed, and molecular docking was performed with the lignans with the best predicted biological activity. The results showed more anticancer activity in the dibenzocyclooctadiene, furofuran and aryltetralin subclasses. The lignans with the best predictive values of biological activity showed varying binding energy results in the presence of certain genetic variants.

**Keywords:** lignans; cancer; single nucleotide polymorphisms; virtual screening

### 1. Introduction

The incidence of many types of cancer continues to rise in the global population, despite many successes in screening, prevention and treatment [1]. Several factors contribute to the development and progression of cancer, such as resistance to various drugs and mutations in important genes [2]. The sum of changes in oncogenes, tumor suppressor genes, repair mechanisms and epigenetic changes has led to cancer development [3]. It is impossible to infer how many independent events are required to produce all the changes that result in most human cancers [4]. Therefore, continuous discovery of new therapeutic alternatives is necessary.

**Artigo 5 (Orientação).** Pires HFO, da Silva PR, Dias AL, de Sousa Gomes C, de Sousa NF, Dos Santos AMF, Souza LRP, de Figueiredo Lima JL, Oliveira MCN, Felipe CFB, de Almeida RN, de Castro RD, da Silva Stiebbe Salvadori MG, Scotti MT, Scotti L. Mechanisms Involved in the Therapeutic Effect of Cannabinoid Compounds on Gliomas: A Review with Experimental Approach. Curr Protein Pept Sci. 2023 Aug 30. doi: 10.2174/1389203724666230830125423. Epub ahead of print. PMID: 37649287. Link de acesso: <https://www.eurekaselect.com/article/134162>. **Qualis A4 – ISSN: 1875-5550.**



Current Protein & Peptide Science

Editor-in-Chief >>

ISSN (Print): 1389-2037  
ISSN (Online): 1875-5550

Back | Journal | Subscribe

Review Article

## Mechanisms Involved in the Therapeutic Effect of Cannabinoid Compounds on Gliomas: A Review with Experimental Approach

**Author(s):** Hugo Fernandes Oliveira Pires, Pablo Rayff da Silva, Arthur Lins Dias, Cleyton de Sousa Gomes , Natália Ferreira de Sousa, Aline Matilde Ferreira dos Santos, Livia Roberta Pimenta Souza, Jaislânia Lucena de Figueiredo Lima , Mayara Cecile Nascimento Oliveira, Cícero Francisco Bezerra Felipe, Reinaldo Nóbrega de Almeida, Ricardo Dias de Castro, Mirian Graciela da Silva Stiebbe Salvadori, Marcus Tullius Scotti and Luciana Scotti\* 

(E-pub Abstract Ahead of Print)

**DOI:** [10.2174/1389203724666230830125423](https://doi.org/10.2174/1389203724666230830125423)

**Price:** \$95

**Artigo 6. da Silva, P.R.; Apolinário, N.d.M.; Silva, S.Â.S.d.; Araruna, M.E.C.; Costa, T.B.; e Silva, Y.M.S.d.M.; da Silva, T.G.; de Moura, R.O.; dos Santos, V.L. Anti-Inflammatory Activity of N'-(3-(1H-indol-3-yl)benzylidene)-2-cyanoacetohydrazide Derivative via sGC-NO/Cytokine Pathway. *Pharmaceuticals*, 2023. DOI: 10.3390/ph16101415. Link de acesso: <https://www.mdpi.com/1424-8247/16/10/1415> - **Qualis A1** - 1424-8247.**



pharmaceuticals



Article

## Anti-Inflammatory Activity of N'-(3-(1H-indol-3-yl)benzylidene)-2-cyanoacetohydrazide Derivative via sGC-NO/Cytokine Pathway

Pablo Rayff da Silva <sup>1,2,3</sup>, Nadjaele de Melo Apolinário <sup>1,2</sup>, Simone Ângela Soares da Silva <sup>1,2</sup>, Maria Elaine Cristina Araruna <sup>1,2</sup>, Thássia Borges Costa <sup>1,2</sup>, Yvnni M. S. de Medeiros e Silva <sup>1,3</sup>, Teresinha Gonçalves da Silva <sup>4</sup>, Ricardo Olímpio de Moura <sup>1,3,\*</sup> and Vanda Lucia dos Santos <sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacéuticas, Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande 58429-500, PB, Brazil; pablo-rayff@hotmail.com (P.R.d.S.); nadjaelemelo@gmail.com (N.d.M.A.); simoneangelasoares@gmail.com (S.Â.S.d.S.); elaine.araruna@gmail.com (M.E.C.A.); thassiaborges@gmail.com (T.B.C.); yvnnim@gmail.com (Y.M.S.d.M.e.S.); vandalucliasantos16@gmail.com (V.L.d.S.)

<sup>2</sup> Laboratório de Ensaios Farmacológicos, Departamento de Farmácia, Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande 58429-500, PB, Brazil

<sup>3</sup> Laboratório de Desenvolvimento e Síntese de Fármacos, Departamento de Farmácia, Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande 58429-500, PB, Brazil

<sup>4</sup> Departamento de Antibióticos, Centro de Biotecnologia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife 50740-520, PE, Brazil; teresinha100@gmail.com

\* Correspondence: ricardo.olimpiodemoura@gmail.com; Tel.: +55-83-996280751

**Abstract:** The *N*-acylhydrazone function has been reported as a pharmacophore group of molecules with diverse pharmacological activities, including anti-inflammatory effects. Therefore, this study was designed to evaluate the anti-inflammatory potential of the compound N'-(3-(1H-indol-3-yl)benzylidene)-2-cyanoacetohydrazide (JR19) *in vivo*. The study started with the carrageenan-induced peritonitis model, followed by an investigation of leukocyte migration using the subcutaneous air pouch test and an assessment of the antinociceptive profile using formalin-induced pain. A preliminary molecular docking study focusing on the crystallographic structures of NFκB, iNOS, and sGC was performed to determine the likely mechanism of action. The computational study revealed satisfactory interaction energies with the selected targets, and the same peritonitis model was used to validate the involvement of the nitric oxide pathway and cytokine expression in the peritoneal exudate of mice pretreated with L-NAME or methylene blue. In the peritonitis assay, JR19 (10 and 20 mg/kg) reduced leukocyte migration by 59% and 52%, respectively, compared to the vehicle group, with the 10 mg/kg dose used in subsequent assays. In the subcutaneous air pouch assay, the reduction in cell migration was 66%, and the response to intraplantar formalin was reduced by 39%, particularly during the inflammatory phase, suggesting that the compound lacks central analgesic activity. In addition, a reversal of the anti-inflammatory effect was observed in mice pretreated with L-NAME or methylene blue, indicating the involvement of iNOS and sGC in the anti-inflammatory response of JR19. The compound effectively and significantly decreased the levels of IL-6, TNF-α, IL-17, and IFN-γ, and this effect was reversed in animals pretreated with L-NAME, supporting a NO-dependent anti-inflammatory effect. In contrast, pretreatment with methylene blue only reversed the reduction in TNF-α levels. Therefore, these results demonstrate the pharmacological potential of the novel *N*-acylhydrazone derivative, which acts through the nitric oxide pathway and cytokine signaling, making it a strong candidate as an anti-inflammatory and immunomodulatory agent.

**Keywords:** cytokines; leukocyte migration; *N*-acylhydrazones; nitric oxide; JR19



**Citation:** da Silva, P.R.; Apolinário, N.d.M.; Silva, S.Â.S.d.; Araruna, M.E.C.; Costa, T.B.; e Silva, Y.M.S.d.M.; da Silva, T.G.; de Moura, R.O.; dos Santos, V.L. Anti-Inflammatory Activity of N'-(3-(1H-indol-3-yl)benzylidene)-2-cyanoacetohydrazide Derivative via sGC-NO/Cytokine Pathway. *Pharmaceuticals* **2023**, *16*, 1415. <https://doi.org/10.3390/ph16101415>

Academic Editor: Mary J. Meegan

Received: 17 August 2023

Revised: 13 September 2023

Accepted: 20 September 2023

Published: 5 October 2023



**Copyright:** © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Artigo 7 (Colaborações).** Albino SL, da Silva Moura WC, Reis MMLD, Sousa GLS, da Silva PR, de Oliveira MGC, Borges TKDS, Albuquerque LFF, de Almeida SMV, de Lima MDCA, Kuckelhaus SAS, Nascimento IJDS, Junior FJBM, da Silva TG, de Moura RO. ACW-02 an Acridine Triazolidine Derivative Presents Antileishmanial Activity Mediated by DNA Interaction and Immunomodulation. *Pharmaceuticals* (Basel). 2023 Jan 29;16(2):204. doi: 10.3390/ph16020204. PMID: 37259353; PMCID: PMC9967605. Link de acesso: <https://www.mdpi.com/1424-8247/16/2/204>. **Qualis A1 – ISSN:1424-8247.**



pharmaceuticals



Article

## ACW-02 an Acridine Triazolidine Derivative Presents Antileishmanial Activity Mediated by DNA Interaction and Immunomodulation

Sonaly Lima Albino <sup>1,2,3</sup>, William Charles da Silva Moura <sup>2,3</sup>, Malu Maria Lucas dos Reis <sup>2</sup>, Gleyton Leonel Silva Sousa <sup>2,4</sup>, Pablo Rayff da Silva <sup>5</sup>, Mayara Gabriele Carvalho de Oliveira <sup>6</sup>, Tatiana Karla dos Santos Borges <sup>7</sup>, Lucas Fraga Friaça Albuquerque <sup>7</sup>, Sinará Mônica Vitalino de Almeida <sup>8</sup>, Maria do Carmo Alves de Lima <sup>9</sup>, Selma Aparecida Souza Kuckelhaus <sup>6</sup>, Igor José dos Santos Nascimento <sup>2,3</sup>, Francisco Jaime Bezerra Mendonça Junior <sup>10</sup>, Teresinha Gonçalves da Silva <sup>1</sup> and Ricardo Olímpio de Moura <sup>2,3,\*</sup>



check for updates

**Citation:** Albino, S.L.; da Silva Moura, W.C.; Reis, M.M.L.D.; Sousa, G.L.S.; da Silva, P.R.; de Oliveira, M.G.C.; Borges, T.K.d.S.; Albuquerque, L.F.F.; de Almeida, S.M.V.; de Lima, M.d.C.A.; et al. ACW-02 an Acridine Triazolidine Derivative Presents Antileishmanial Activity Mediated by DNA Interaction and Immunomodulation. *Pharmaceuticals* 2023, 16, 204. <https://doi.org/10.3390/ph16020204>

Academic Editor: Maria Lurdes Santos Cristiano

Received: 27 December 2022

Revised: 26 January 2023

Accepted: 27 January 2023

Published: 29 January 2023



**Copyright:** © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

- <sup>1</sup> Programa de Pós Graduação em Inovação Terapêutica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife 50670-901, Brazil
  - <sup>2</sup> Laboratório de Desenvolvimento e Síntese de Fármacos, Departamento de Farmácia, Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande 58429-500, Brazil
  - <sup>3</sup> Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande 58429-500, Brazil
  - <sup>4</sup> Programa de Pós Graduação em Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica 23890-000, Brazil
  - <sup>5</sup> Programa de Pós Graduação em Produtos Naturais, Sintéticos e Bioativos, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa 58051-900, Brazil
  - <sup>6</sup> Área de Morfologia, Faculdade de Medicina—UnB, Universidade de Brasília, Campus Darcy Ribeiro/Asa Norte, Brasília 70910-900, Brazil
  - <sup>7</sup> Laboratório de Imunologia Celular, Área de Patologia, Faculdade de Medicina, Campus Darcy Ribeiro, Brasília 70910-900, Brazil
  - <sup>8</sup> Faculdade de Ciências, Educação e Tecnologia de Garanhuns (FACETEG), Universidade de Pernambuco, Garanhuns 55290-000, Brazil
  - <sup>9</sup> Laboratório de Química e Inovação Terapêutica, Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco, Recife 50670-901, Brazil
  - <sup>10</sup> Laboratório de Síntese e Vetorização de Moléculas, Universidade Estadual da Paraíba, João Pessoa 58071-160, Brazil
- \* Correspondence: [ricardo.olimpiodemoura@gmail.com](mailto:ricardo.olimpiodemoura@gmail.com) or [ricardo.olimpiodemoura@servidor.uepb.edu.br](mailto:ricardo.olimpiodemoura@servidor.uepb.edu.br)

**Abstract:** The present study proposed the synthesis of a novel acridine derivative not yet described in the literature, chemical characterization by NMR, MS, and IR, followed by investigations of its antileishmanial potential. In vitro assays were performed to assess its antileishmanial activity against *L. amazonensis* strains and cytotoxicity against macrophages through MTT assay and annexin V-FITC/PI, and the ability to perform an immunomodulatory action using CBA. To investigate possible molecular targets, its interaction with DNA in vitro and in silico targets were evaluated. As results, the compound showed good antileishmanial activity, with IC<sub>50</sub> of 6.57 (amastigotes) and 94.97 (promastigotes) µg mL<sup>-1</sup>, associated with non-cytotoxicity to macrophages (CC<sub>50</sub> > 256.00 µg mL<sup>-1</sup>). When assessed by flow cytometry, 99.8% of macrophages remained viable. The compound induced an antileishmanial effect in infected macrophages and altered TNF-α, IL-10 and IL-6 expression, suggesting a slight immunomodulatory activity. DNA assay showed an interaction with the minor grooves due to the hyperchromic effect of 47.53% and Kb 1.17 × 10<sup>6</sup> M<sup>-1</sup>, and was sustained by docking studies. Molecular dynamics simulations and MM-PBSA calculations propose cysteine protease B as a possible target. Therefore, this study demonstrates that the new compound is a promising molecule and contributes as a model for future works.

**Keywords:** leishmaniasis; immunomodulation; DNA binding; molecular docking; molecular dynamics

**Artigo 8.** da Silva PR, do Espírito Santo RF, Melo CO, Pachú Cavalcante FE, Costa TB, Barbosa YV, E Silva YMSM, de Sousa NF, Villarreal CF, de Moura RO, Dos Santos VL. The Compound (*E*)-2-Cyano-*N*,3-diphenylacrylamide (JMPR-01): A Potential Drug for Treatment of Inflammatory Diseases. *Pharmaceutics*. 2022 Jan 13;14(1):188. doi: 10.3390/pharmaceutics14010188. PMID: 35057082; PMCID: PMC8777680. Link de acesso: <https://www.mdpi.com/1999-4923/14/1/188>. **Qualis A2 – ISSN: 1424-8247.**



Article

## The Compound (*E*)-2-cyano-*N*,3-diphenylacrylamide (JMPR-01): A Potential Drug for Treatment of Inflammatory Diseases

Pablo Rayff da Silva <sup>1,2,3</sup>, Renan Fernandes do Espírito Santo <sup>4,5</sup>, Camila de Oliveira Melo <sup>1,3</sup>, Fábio Emanuel Pachú Cavalcante <sup>2</sup>, Thássia Borges Costa <sup>2</sup>, Yasmim Vilarim Barbosa <sup>2</sup>, Yvnni M. S. de Medeiros e Silva <sup>3</sup>, Natália Ferreira de Sousa <sup>6</sup>, Cristiane Flora Villarreal <sup>4,5</sup>, Ricardo Olimpio de Moura <sup>1,3</sup> and Vanda Lucia dos Santos <sup>1,2,\*</sup>

**Citation:** da Silva, P.R.; do Espírito Santo, R.F.; de Oliveira Melo, C.; Pachú Cavalcante, F.E.; Costa, T.B.; Barbosa, Y.V.; de Medeiros e Silva, Y.M.S.; de Sousa, N.F.; Villarreal, C.F.; de Moura, R.O.; et al. The Compound (*E*)-2-cyano-*N*,3-diphenylacrylamide (JMPR-01): A Potential Drug for Treatment of Inflammatory Diseases. *Pharmaceutics* **2022**, *14*, 188. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14010188>

Academic Editors: João Augusto Osório Júnior and Arnobio A. da Silva-Junior

Received: 16 December 2021  
Accepted: 10 January 2022  
Published: 13 January 2022

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

<sup>1</sup> Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacéuticas, Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande 58429-500, PB, Brazil; pablo-rayff@hotmail.com (P.R.d.S.); camillamelo@hotmail.com (C.d.O.M.); ricardo.olimpiodemoura@gmail.com (R.O.d.M.)

<sup>2</sup> Laboratório de Ensaios Farmacológicos, Departamento de Farmácia, Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande 58429-500, PB, Brazil; fabiocavalcante221@gmail.com (F.E.P.C.); thassiacosta5@gmail.com (T.B.C.); yasmimvilarim.b@gmail.com (Y.V.B.)

<sup>3</sup> Laboratório de Desenvolvimento e Síntese de Fármacos, Departamento de Farmácia, Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande 58429-500, PB, Brazil; Yvnnim@gmail.com

<sup>4</sup> Instituto Gonçalo Moritz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador 40296-710, BA, Brazil; r.fernandes88@hotmail.com (R.F.d.E.S.); cfv@ufba.br (C.F.V.)

<sup>5</sup> Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia, Salvador 40170-290, BA, Brazil

<sup>6</sup> Programa de Pós Graduação em Produtos Naturais, Sintéticos e Biotivos, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa 58051-900, PB, Brazil; nferreiradesousa.nfs@gmail.com

\* Correspondence: vandalucliasantos16@gmail.com; Tel: +55-83-9-8846-6949

**Abstract:** The compound (*E*)-2-cyano-*N*,3-diphenylacrylamide (JMPR-01) was structurally developed using bioisosteric modifications of a hybrid prototype as formed from fragments of indomethacin and paracetamol. Initially, *in vitro* assays were performed to determine cell viability (in macrophage cultures), and its ability to modulate the synthesis of nitrite and cytokines (IL-1 $\beta$  and TNF $\alpha$ ) in non-cytotoxic concentrations. *In vivo*, anti-inflammatory activity was explored using the CFA-induced paw edema and zymosan-induced peritonitis models. To investigate possible molecular targets, molecular docking was performed with the following crystallographic structures: LT-A4-H, PDE4B, COX-2, 5-LOX, and iNOS. As results, we observed a significant reduction in the production of nitrite and IL-1 $\beta$  at all concentrations used, and also for TNF $\alpha$  with JMPR-01 at 50 and 25  $\mu$ M. The anti-edematogenic activity of JMPR-01 (100 mg/kg) was significant, reducing edema at 2–6 h, similar to the dexamethasone control. In induced peritonitis, JMPR-01 reduced leukocyte migration by 61.8, 68.5, and 90.5% at respective doses of 5, 10, and 50 mg/kg. *In silico*, JMPR-01 presented satisfactory coupling; mainly with LT-A4-H, PDE4B, and iNOS. These preliminary results demonstrate the strong potential of JMPR-01 to become a drug for the treatment of inflammatory diseases.

**Keywords:** bioisosterism; phenylacrylamide; immunomodulation; inflammation

### 1. Introduction

Inflammation is the body's reaction to aggressive chemical, physical, or biological agents, promoting coordinated activation of signaling pathways with the aim of instituting repair processes. The process is initiated by activation of standard cell surface receptors, which recognize stimuli, and activate intracellular signaling cascades, inducing the translocation of transcription factors and resulting in the expression of various inflammatory mediators [1,2]. At the tissue level, during the inflammatory response, typical acute symptoms such as edema, redness, heat, and pain, which may progress to loss of tissue function, are observed [3,4].

**Artigo 9 (Colaborações).** Jéssica C. Andrade, Álefe B. Monteiro, Humberto H. N. Andrade, Thallita K. S. N. Gonzaga, Pablo R. Silva, Danielle N. Alves, Ricardo D. Castro, Mayara S. Maia, Marcus T. Scotti, Damião P. Sousa, Reinaldo N. Almeida, "Involvement of GABAA Receptors in the Anxiolytic-Like Effect of Hydroxycitronellal", BioMed Research International, vol. 2021, Article ID 9929805, 17 pages, 2021. <https://doi.org/10.1155/2021/9929805>. Link de acesso: <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2021/9929805/#related-articles>. **Qualis A3** – ISSN: 2314-6141.

Hindawi  
BioMed Research International  
Volume 2021, Article ID 9929805, 17 pages  
<https://doi.org/10.1155/2021/9929805>



## Research Article

# Involvement of GABA<sub>A</sub> Receptors in the Anxiolytic-Like Effect of Hydroxycitronellal

Jéssica C. Andrade <sup>1</sup>, Álefe B. Monteiro <sup>1</sup>, Humberto H. N. Andrade <sup>1</sup>, Thallita K. S. N. Gonzaga <sup>1</sup>, Pablo R. Silva <sup>1</sup>, Danielle N. Alves <sup>2</sup>, Ricardo D. Castro <sup>2</sup>, Mayara S. Maia <sup>3</sup>, Marcus T. Scotti <sup>3</sup>, Damião P. Sousa <sup>4</sup>, and Reinaldo N. Almeida <sup>1</sup>

<sup>1</sup>Psychopharmacology Laboratory, Institute of Drugs and Medicines Research, Federal University of Paraíba, Campus I, 58051-085, Via Ipê Amarelo/SN, João Pessoa, Paraíba, Brazil

<sup>2</sup>Department of Clinic and Social Dentistry, Center for Health Sciences, Federal University of Paraíba, Campus I, João Pessoa, PB, Brazil

<sup>3</sup>Cheminformatics Laboratory, Institute of Drugs and Medicines Research, Federal University of Paraíba, Campus I, 58051-900, Via Ipê Amarelo/SN, João Pessoa, Paraíba, Brazil

<sup>4</sup>Pharmaceutical Chemistry Laboratory, Institute of Drugs and Medicines Research, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Brazil

Correspondence should be addressed to Reinaldo N. Almeida; [reinaldoan@uol.com.br](mailto:reinaldoan@uol.com.br)

Received 7 March 2021; Accepted 3 June 2021; Published 17 June 2021

Academic Editor: Bogdan Tamba

Copyright © 2021 Jéssica C. Andrade et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Hydroxycitronellal (HC) is a monoterpene present in essential oils of aromatic plants of different species, obtained from semisynthesis of citronellal, and is widely used as a fragrance in cosmetics. The objective of this work was to evaluate the possible anxiolytic-like activity of HC and its possible mechanism of action using *in vivo* and *in silico* methodologies. Swiss male mice (*Mus musculus*) were treated with HC (12.5, 25, and 50 mg/kg, i.p.) and subjected to the rota rod, elevated plus maze, and open field tests. No significant impairments were observed in the rota rod tests for the motor activity of the animals treated with HC at 12.5, 25, and 50 mg/kg, i.p., indicating no myo-relaxing or sedative effects. In the elevated plus maze, HC (in the three doses) induced significant increases in the percentage of entries (respectively, 34.8%, 33.8%, and 38.6%) and in the length of stay (respectively, 49.9%, 56.1%, and 57.0%) in the open arms of the EPM, as well as the number of crossings in the open field tests. The mechanism of action of the compound's anxiolytic-like activity can be attributed to the involvement of GABA<sub>A</sub> receptors, and this interaction was observed in *in vivo* and *in silico* studies. For HC, the results suggest anxiolytic-like effects, possibly via modulation of the GABAergic system. The use of natural products to treat anxiety can become an alternative to existing synthetic products.

## 1. Introduction

Anxious behavior is part of the normal spectrum of human experience. In certain situations, all people in life experience anxiety, especially when faced with some warning of imminent danger. This reaction allows us to escape from dangerous situations, as well as to improve our response in the face of adverse conditions when imposed by the environment

[1]. If the risk response is emotionally disproportionate to the situation that triggers it, anxiety becomes a disorder [2].

Inherited genetic, neurobiological, environmental, and traumatic experiences can trigger pathologically anxious behavior. Anxious disorders are a clinical condition in which anxiety is the primary symptom and does not originate in other disorders, such as depression [3]. According to the World Health Organization, the proportion of the

**Artigo 10 (Colaborações).** Araruna ME, Silva P, Almeida M, Rêgo R, Dantas R, Albuquerque H, Cabral I, Apolinário N, Medeiros F, Medeiros A, Santos V. Tablet of *Spondias mombin* L. Developed from Nebulized Extract Prevents Gastric Ulcers in Mice via Cytoprotective and Antisecretory Effects. *Molecules*. 2021 Mar 12;26(6):1581. doi: 10.3390/molecules26061581. PMID: 33809398; PMCID: PMC8001497. Link de acesso: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8001497/>. **Qualis A2 – ISSN: 1420-3049.**



Article

## Tablet of *Spondias mombin* L. Developed from Nebulized Extract Prevents Gastric Ulcers in Mice via Cytoprotective and Antisecretory Effects

Maria Elaine Araruna <sup>1,2,\*</sup>, Pablo Silva <sup>1,2</sup>, Maria Almeida <sup>1,2</sup>, Renaly Rêgo <sup>1,2</sup>, Raiff Dantas <sup>2</sup>, Hilton Albuquerque <sup>2</sup>, Ingrid Cabral <sup>2</sup>, Nadjaele Apolinário <sup>1,2</sup>, Francinalva Medeiros <sup>1,2</sup>, Ana Medeiros <sup>1,2</sup> and Vanda Santos <sup>1,2,\*</sup>

- <sup>1</sup> Postgraduate Program in Pharmaceutical Sciences, State University of Paraíba, Campina Grande, PB 58429-500, Brazil; pablo-rayff@hotmail.com (P.S.); cris.freire21@hotmail.com (M.A.); renaly.ivyna@hotmail.com (R.R.); nadjaelemelo@gmail.com (N.A.); francinalvamedeiros@gmail.com (F.M.); anaclaudiamedeiros.uepb@gmail.com (A.M.)
- <sup>2</sup> Department of Pharmacy, State University of Paraíba, Campina Grande, PB 58429-500, Brazil; raiff.sd@hotmail.com (R.D.); hiltoncesar00@hotmail.com (H.A.); ingridocabral@hotmail.com (I.C.)
- \* Correspondence: elaine.araruna@gmail.com (M.E.A.); vandaluciasantos16@gmail.com (V.S.); Tel.: +55-(83)-99968-5619 (M.E.A.); +55-(83)-98846-6949 (V.S.)



Citation: Araruna, M.E.; Silva, P.; Almeida, M.; Rêgo, R.; Dantas, R.; Albuquerque, H.; Cabral, I.; Apolinário, N.; Medeiros, F.; Medeiros, A.; et al. Tablet of *Spondias mombin* L. Developed from Nebulized Extract Prevents Gastric Ulcers in Mice via Cytoprotective and Antisecretory Effects. *Molecules* **2021**, *26*, 1581. <https://doi.org/10.3390/molecules26061581>

Academic Editor: Gianluca Paventi

Received: 17 February 2021  
Accepted: 7 March 2021  
Published: 12 March 2021

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Abstract:** *Spondias mombin* L. (Anacardiaceae) has a worldwide distribution and is present in all regions of Brazil. Its leaves, flowers and bark are used as teas in folk medicine to treat diseases of the digestive system. This study aimed to evaluate the acute non-clinical toxicity, gastroprotective activity, and the related mechanisms of action of nebulized extract and tablets based on dried *Spondias mombin* (SmNE). SmNE screening showed the presence of flavonoids (0.65%), polyphenols (25.50%), where the major compound is gallic acid. In the acute oral toxicity assay, a dose of 2000 mg/kg of SmNE administered orally in Swiss mice did not induce any behavioral changes. SmNE (250 or 500 mg/kg p.o.) significantly reduced the ulcerative lesion area when compared to the control group in ethanol and non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAIDs) models. Results showed that treatment with SmNE (250 mg/kg) reduced acid secretion and gastric content, accompanied with an increase in pH. Previous administration of indomethacin and glibenclamide reversed the protection provided by SmNE, confirming the participation of prostaglandins (PGs) and ATP-sensitive potassium channels (KATP) in its gastroprotective effect. The SmNE tablets met the pharmacopeial quality requirements with gastroprotective activity and similar protection in comparison to the isolated extract administrated. In conclusion, SmNE has a gastroprotective activity related to cytoprotective mechanisms, such as the participation of endogenous prostaglandins and KATP channels, having an anti-secretory effect with systemic action. The formulation obtained presented gastroprotective effects similar to the administration of the extract, the tablets showed favorable compression characteristics by the direct route and met the pharmacopeial quality requirements.

**Keywords:** gastric ulcer; *Spondias mombin*; cytoprotection; herbal medicine

### 1. Introduction

Peptic ulcers are pathologically defined as damage to the mucosal wall, which can reach from the muscle layer to deeper regions, affecting components of the epithelial and connective tissue, including subepithelial myofibroblasts, smooth muscle cells, vessels, and nerves [1].

Among the main types of ulcers, the gastric one stands out as being the most prevalent in the digestive tract, affecting about 10% of the world's population. It is considered an expanding disease due to current lifestyle trends that include excessive consumption of alcohol and non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), contamination by *Helicobacter*

**Artigo 11 (Artigo aceito para publicação – colaboração).** Natália F. da Silva.; Igor Mikael A. de Araújo.; Teresa Carolinny M. L. Rodrigues.; Pablo R. da Silva.; Marcus T. Scotti.; Luciana Scotti. *In silico* Pharmacophore Models Proposition for Malaria: A Review. *Combinatory Chemistry & High Throught Screening*. **Artigo aceito para publicação – ISSN (18755402.) – Qualis A4.**

05/10/2023, 12:35

E-mail de Laboratório de Tecnologia Farmacéutica - Fwd: Manuscript Provisional Acceptance letter | BMS-CCHTS-2023-HT55-4...



NATÁLIA FERREIRA DE SOUSA <nataliafsousa@lft.ufpb.br>

**Fwd: Manuscript Provisional Acceptance letter | BMS-CCHTS-2023-HT55-4691-4**

4 mensagens

Luciana Scotti <luciana.scotti@gmail.com>

15 de agosto de 2023 às 12:21

Para: NATÁLIA FERREIRA DE SOUSA <nataliafsousa@lft.ufpb.br>

**Prof. Dr. Luciana Scotti, PhD.**  
**Commander of Pharmaceutical Merit**  
**Cheminformatics Laboratory- Postgraduate Program in Natural Products and Synthetic Bioactive**  
**Quality Management - University Hospital**  
**Federal University of Paraíba-Campus I**  
**58051-970, João Pessoa, PB, Brazil**

[orcid.org/0000-0003-1866-4107](https://orcid.org/0000-0003-1866-4107)  
<http://www.researcherid.com/rid/C-7811-2013>  
[\[https://www.eurekaselect.net/ebook\\_volume/3327\]](https://www.eurekaselect.net/ebook_volume/3327)  
<http://lattes.cnpq.br/6420461345651715>  
<https://scholar.google.com.br/citations?user=InR70ikAAAAJ&hl=es>  
<https://luscotti.blogspot.com/>

----- Forwarded message -----

From: **Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening** <admin@bentham.manuscriptpoint.com>

Date: Tue, Aug 15, 2023 at 5:02 AM

Subject: Manuscript Provisional Acceptance letter | BMS-CCHTS-2023-HT55-4691-4

To: <luciana.scotti@gmail.com>

Cc: <ambreenirshad@benthamscience.net>

**Reference#:** BMS-CCHTS-2023-HT55-4691-4

**Submission Title:** In silico Proposition of Pharmacophore Models for Malaria: An Overview of the Literature

Dear Dr. Luciana Scotti,

I am pleased to inform you that your article Reference No. BMS-CCHTS-2023-HT55-4691-4, entitled "**In silico Proposition of Pharmacophore Models for Malaria: An Overview of the Literature**" has been provisionally approved for further processing in "**Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening**".

**You will now need to pay the processing fee for research articles only, either via the online payment link in the invoice sent to you or, via a bank transfer (evidence of which would need to be sent to us), before your article is published.**

Please note that the final acceptance of your article is subject to a further detailed scrutiny and resolution of the following issues:

- a. The standard of English language in the articles should be suitable.
- b. "IMRAD" Structure: Headings such as Introduction/background, Methods and Materials, Experimental, Result and Discussion are mandatory for research articles.
- c. Abstract should be in the format of a STRUCTURED ABSTRACT, having explicit headings such as background, introduction, method, result and conclusion
- d. References should be in the correct format. This will vary from journal to journal.
- e. All references mentioned in the reference list should be cited in the text, and vice versa.
- f. The quality of the figures in the articles should be as per Publisher's standard mentioned on the website.
- g. Permission should have been obtained for use of copyright material from the appropriate sources (including the Internet) and submitted to us.
- h. There should be no difference in the list of Authors in the revised manuscript, from what was submitted at the time of submission of the article. Please remember that the author list cannot be modified at a later stage.

<https://mail.google.com/mail/u/1/?ik=9bb0795876&view=pt&search=all&permthid=thread-f:1774309002424984451&simpl=msg-f:17743090024249844...> 1/3

## REVIEW ARTICLE

***In silico* Pharmacophore Models proposition for Malaria: A review**

Natália Ferreira de Sousa<sup>a</sup>, Igor Mikael Alves de Araújo<sup>a</sup>, Teresa Carrolliny Moreira Lustoza Rodrigues<sup>a</sup>, Pablo Rayff da Silva<sup>a</sup>, Jéssica Paiva de Moura<sup>a</sup>, Marcus Tullius Scotti<sup>a</sup>, Luciana Scotti<sup>a\*</sup>.

<sup>a</sup>Postgraduate Program of Natural and Synthetic Bioactive Products (PgPNSB), Health Sciences Center, Federal University of Paraíba, João Pessoa-PB, Brazil.

## ARTICLE HISTORY

Received:  
Revised:  
Accepted:

DOI:

**Abstract:** In the field of medicinal chemistry, the concept of pharmacophore refers to the specific region of a molecule that possesses essential structural and chemical characteristics for binding to a receptor and eliciting biological activity. Understanding the pharmacophore is crucial for drug research and development, as it allows the design of new drugs. Malaria, a widespread disease, is commonly treated with chloroquine and artemisinin, but the emergence of parasite resistance limits their effectiveness. This study aims to explore computer simulations to discover a specific pharmacophore for Malaria, providing new alternatives for its treatment. **Method:** A literature review was conducted, encompassing articles proposing a pharmacophore for Malaria, gathered from the "Web of Science" database, with a focus on recent publications to ensure up-to-date analysis. **Results and discussion:** The selected articles employed diverse methods, including ligand-based and structure-based approaches, integrating molecular structure and biological activity data to yield comprehensive analyses. Affinity evaluation between the proposed pharmacophore and the target receptor involved calculating free energy to quantify their interaction. Multiple linear regression was commonly utilized, though it is sensitive to multicollinearity issues. Another recurrent methodology was the use of the Schrödinger package, employing tools such as the Phase module and the OPLS force field for interaction analysis. **Conclusion:** Pharmacophore model proposition allows three-dimensional representations guiding the synthesis and design of new biologically active compounds, offering a promising avenue for discovering therapeutic agents to combat Malaria.

**Keywords:** Malaria, Medicinal Chemistry, *In silico*, Pharmacophore, *Plasmodium falciparum*, Computer Aided Drug Design (CADD).

## 1. INTRODUCTION

Malaria is an infectious disease that poses a significant challenge to global health [1,2]. It is caused by the *Plasmodium* parasite and transmitted to humans through the bite of mosquitoes of the genus *Anopheles* [3]. Considered one of the main tropical diseases, malaria mainly affects regions with hot and humid climates, endangering the lives of millions of people around the world [4].

The World Health Organization (WHO) estimates that hundreds of millions of cases of malaria occur annually, resulting in a substantial number of deaths [5]. Although the disease is prevalent in various parts of the world, it is in the Sub-Saharan Africa region that most cases and deaths are concentrated, especially among children under five years of age [6].

Malaria thus places a disproportionate burden on the most vulnerable populations, exacerbating health inequality and socioeconomic impact [7].

Malaria is a complex and variable disease due to the diversity of *Plasmodium* species that cause it. Among the five existing species, two of them, *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax*, are responsible for the most severe cases and deaths related to malaria [8]. *P. falciparum* infection is characterized by its ability to rapidly multiply in blood cells, which contributes to the severity of the infection. On the other hand, *P. vivax* is less fatal than *P. falciparum*, but it can lead to prolonged and recurrent illness. A peculiarity of *P. vivax* is that the parasites can remain dormant in the liver for long periods, resulting in disease relapses months or even years after the initial infection. These distinct characteristics among *Plasmodium* species have significant implications for the diagnosis, treatment and prevention of malaria in different regions of the world [9–11].

\*Address correspondence to this author at the Chemoinformatic Laboratory, Federal University of Paraíba, Paraíba, Brazil; E-mail: [luciana.scotti@gmail.com](mailto:luciana.scotti@gmail.com).

**Artigo 12.** Pablo Rayff da Silva, Natalia Diniz Nunes Pazos, Jéssica Cabral de Andrade, Natália Ferreira de Sousa, Hugo Fernandes Oliveira Pires, Jaislânia Lucena de Figueiredo Lima, Arthur Lins Dias, Mirian Graciela da Silva Stiebbe Salvadori, Adriana Maria Fernandes de Oliveira Golzio, Ricardo Dias de Castro, Marcus T. Scotti, Cícero Francisco Bezerra Felipe, Reinaldo Nóbrega de Almeida, Luciana Scotti. Mini Review in Medicinal Chemistry – **Qualis A2.**

Fwd: Final Round of Revision | BMS-MRMC-2023-128

<https://luscotti.blogspot.com/>

----- Forwarded message -----  
From: **Editorial Office** <[admin@bentham.manuscriptpoint.com](mailto:admin@bentham.manuscriptpoint.com)>  
Date: Sun, Jun 25, 2023 at 3:45 PM  
Subject: Final Round of Revision | BMS-MRMC-2023-128  
To: <[luciana.scotti@gmail.com](mailto:luciana.scotti@gmail.com)>, <[tabindarao@benthamsience.net](mailto:tabindarao@benthamsience.net)>

**Reference#: BMS-MRMC-2023-128**

Submission Title: Review with an in silico approach of linalool and its metabolites

Dear Dr. Scotti,

Please provide the required details.

#### REVIEW ARTICLE

##### Pharmacological Mechanisms Involved in the Antinociceptive Effect of Linalool and its Metabolites: An *in silico* approach to Exploring the Biological Activities of Linalool and its Metabolites

Pablo Rayff da Silva\*, Natália Diniz Nunes Pazos<sup>†</sup>, Jéssica Cabral de Andrade, Natália Ferreira de Sousa<sup>†</sup>, Hugo Fernandes Oliveira Pires<sup>†</sup>, Jaislânia Lucena de Figueiredo Lima<sup>†</sup>, Arthur Lins Dias<sup>†</sup>, Mirian Graciela da Silva Stiebbe Salvadori<sup>†</sup>, Adriana Maria Fernandes de Oliveira Golzio<sup>†</sup>, Ricardo Dias de Castro<sup>†</sup>, Marcus T. Scotti<sup>†</sup>, Cícero Francisco Bezerra Felipe<sup>†</sup>, Reinaldo Nóbrega de Almeida<sup>†</sup>, Luciana Scotti<sup>†</sup>\*

\**Psychopharmacology Laboratory, Institute of Drugs and Medicines Research, Federal University of Paraíba, 58051-065, Via Espírito Santo, S/N, João Pessoa, Paraíba, Brazil.*

<sup>†</sup>*Chemotherapy Laboratory, Institute of Drugs and Medicines Research, Federal University of Paraíba, 58051-900, Via Espírito Santo, S/N, João Pessoa, Paraíba, Brazil.*

**ABSTRACT: Introduction** - Pain is characterized by the unpleasant sensory and emotional sensation associated with actual or potential tissue damage, whereas nociception refers to the mechanism by which noxious stimuli are transmitted from the periphery to the CNS. The main drugs used to treat pain are nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) and opioid analgesics, which have side effects that limit their use. Therefore, in the search for new drugs with potential antinociceptive effects, essential oils have been studied, whose constituents (monoterpenes) are emerging as a new therapeutic possibility. Among them, linalool and its metabolites stand out. **Aim** - The present study aims to investigate the antinociceptive potential of linalool and its metabolites through a screening using an *in silico* approach. **Methods** - Molecular docking was used to evaluate possible interactions with important targets involved in antinociceptive activity, such as  $\alpha_2$ -adrenergic, GABAergic, muscarinic, opioid, adrenergic, transient potential, and glutamatergic receptors. **Results** - The compounds in the investigated series obtained negative energies for all enzymes, representing satisfactory interactions with the targets and highlighting the multi-target potential of the L4 metabolite. **Conclusion** - Linalool and its metabolites have a high likelihood of modulatory activity against the targets involved in nociception and are potential candidates for future drugs.

**Keywords:** Monoterpenes, Tetrahydrolinalool, Nociception, Essential Oils, Molecular Docking.

\*Address correspondence to the author at the Postgraduate Program of Natural and Synthetic Bioactive Products (PPqNSB), Health Sciences Center, Federal University of Paraíba, João Pessoa-PB, Brazil. E-mail: [luciana.scotti@unipar.edu.br](mailto:luciana.scotti@unipar.edu.br)

#### 1. INTRODUCTION

Pain is a complex experience characterized by sensory information conveyed by an unpleasant stimulus through modifications of an effector, cultural, and cognitive nature [1, 2]. It represents a multidimensional protective and survival mechanism that directly affects the patient's quality of life [3]. Pain may be classified according to its physiological mechanism or duration. Acute pain involves tissue damage followed by activation of local nociceptors responsible for detecting noxious stimuli and can last for days to weeks. Chronic pain, on the other hand, has no single causative agent, lasts longer than acute pain, and increases the responsiveness and sensitivity of the systems involved in pain perception [2]. Improving knowledge of the temporal classification of pain may advance understanding of the physiological basis of nociception, which, unlike pain, is not a subjective sensation but rather the physiological encoding of the processing of nociceptive stimuli since pain and nociception can exist independently [4, 5].

According to the Brazilian Society for the Study of Pain (*Sociedade Brasileira para o Estudo da Dor* [SBED]), the prevalence of chronic pain in Brazil is between 30% and 50%. This result is similar to that found in developed countries [2]. In addition, the prevalence of chronic pain is higher than that of asthma and diabetes, with a prevalence of 20% in adults, which increases with age (32% of adults aged 25-34 and 62% of adults over 75) [6]. The lack of studies and precise data on the problem of pain hinders its management and the screening of patients with acute and chronic pain as well as their referral to centers or units capable of treating them before the problem worsens [2].

Analgesics, nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), and opioids are the most commonly used therapeutic approaches by patients with acute or chronic pain. The NSAIDs are widely used in clinical practice for the relief and treatment of pain, fever, and inflammatory disorders, and include several classifications based on their chemical composition and mechanism of action [7, 8]. Opioids have the potential to regulate pain sensation in the central and peripheral nervous systems due to their analgesic effects [9]; moreover, this class of drugs is the most commonly used in pain management, according to the World Health Organization (WHO) [10]. However, the use of these drug therapies causes several adverse effects that affect the patient's well-being, especially when used for a long time [4, 11].

**Artigo 13 (Artigo aceito para publicação).** Caroline Leal Rodrigues Soares<sup>1#</sup>, Polrat Wilai-ratana<sup>2\*#</sup>, Larissa Rodrigues Silva<sup>1</sup>, Polyanna Silva Moreira<sup>1</sup>, Henrique Douglas Melo Coutinho<sup>3\*</sup>, Pablo Rayff da Silva<sup>1</sup>, Irwin Rose Alencar de Menezes<sup>4</sup> e Cícero Francisco Bezerra Felipe<sup>1\*</sup>. Biomedicine & Pharmacotherapy - **Qualis A1**.

Dear Dr Silva,

Thank you for publishing your article in Biomedicine & Pharmacotherapy . Dr Coutinho completed the Rights and Access Form for your article *Biochemical aspects of the inflammatory process: a narrative review* on October 18, 2023.

The Order Summary is attached to this email. A copy of the Order Summary is also sent to all co-authors for whom we have contact details.

Your article will be free for everyone to read online as soon as it is published.



If you have any questions, please do not hesitate to contact us. To help us assist you, please quote our article reference BIOPHA\_115764 in all correspondence.

Now that your article has been accepted, you will want to maximize the impact of your work. Elsevier facilitates and encourages authors to share their article responsibly. To learn about the many ways in which you can share your article whilst respecting copyright, visit: [www.elsevier.com/sharing-articles](http://www.elsevier.com/sharing-articles).

**Artigo 14 (Artigo submetido– relacionado à tese):**

**Anticonvulsant activity of tetrahydrolinalool: behavioral, electrophysiological, and molecular docking approaches**

**Diogo V. Fonsêca<sup>1</sup>; Juliana S. Rocha<sup>1</sup>; Leandra Eugênia G. de Oliveira<sup>2</sup>; Edilson B. Alencar Filho<sup>1,3</sup>; Flavia M. S. Reis<sup>3</sup>; Erika B. M. Cavalho<sup>3</sup>; Pablo R. Silva<sup>4</sup>; Natalia D. N. Pazos<sup>4</sup>; Natália Ferreira de Sousa<sup>4</sup>; Hugo Fernandes O. Pires<sup>4</sup>; Erika C. Guedes<sup>4</sup>; Leandro R. Ribeiro<sup>4</sup>; Rita de Cassia S. Sá<sup>4</sup>; Mirian G. S. S. Salvadori<sup>4</sup>; Damião P. Sousa<sup>4</sup>; Marcus Tullius Scotti<sup>4</sup>; Cicero F. B. Felipe<sup>4</sup>; Reinaldo N. de Almeida<sup>4</sup>; Luciana Scotti<sup>4,\*</sup>**

<sup>1</sup> Postgraduate Program in Biosciences - PPGb, Federal University of Vale do São Francisco - UNIVASF, Petrolina/PE, Brazil.

<sup>2</sup>Department of Biological Sciences, State University of Southwest Bahia (UESB), Rua José Moreira Sobrinho s/n, Jequiezinho, Jequie, BA 45210-506, Brazil

<sup>3</sup>Collegiate of Pharmaceutical Sciences, Postgraduate Program in Health and Biological Sciences, Federal University of San Francisco Valley (UNIVASF), Petrolina, PE 56304-917, Brazil;

<sup>4</sup>Postgraduate Program of Natural and Synthetic Bioactive Products (PPgPNSB), Health Sciences Center, Federal University of Paraíba, João Pessoa, PB 58051-085, Brazil.

**\*Correspondence:**

<sup>4</sup> Chemoinformatics Laboratory, Institute of Drugs and Medicines Research, Federal University of Paraíba, 58051-900, Via Ipê Amarelo, S/N, João Pessoa, Paraíba, Brazil. E-mail: Luciana.scotti@gmail.com

### Capítulos de Livro:

- DIAS, A. L. *et al.* Canabibis sp. como alternativa terapêutica para epilepsia: uma revisão bibliográfica. **Internacional Saúde Única (Interface Mundial)**. Ebook, Recife, Pernambuco, 2023. DOI:10.29327/vcidsu20231.611088.
- JÚNIOR, L. V. D. *et al.* Estudos Quimioinformáticos de Diterpenos como Possíveis Agentes Terapêuticos Para Tratamento da Tripanossomíase Americana. **Internacional Saúde Única (Interface Mundial)**. Ebook, Recife, Pernambuco, 2023. DOI: 10.29327/vcidsu20231.611095.
- FERNANDES, H. O. P. *et al.* O déficit de memória em pacientes portadores de epilepsia do lobo temporal: uma revisão bibliográfica. **Internacional Saúde Única (Interface Mundial)**. Ebook, Recife, Pernambuco, 2023. DOI: 10.29327/vcidsu20231.611087.
- LEOCÁDIO, A. L. *et al.* Uso de naltrexona-bupropiona no tratamento da obesidade. **Internacional Saúde Única (Interface Mundial)**. Ebook, Recife, Pernambuco, 2023. DOI: 10.29327/vcidsu20231.611087.

### Trabalhos apresentados/aceitos para apresentação em evento internacional:

- Computational studies of selenoethylene lactamides with potential anti-SARS-CoV-2 activity - **2nd Brazil France Symposium on Medicinal Chemistry**, 2023.
- Tetrahydrolinalool modulates LPS-induced microglia/macrophage activated phenotype- **International Symposium on Neurochemistry and Pathophysiology of the Glial Cell and Advanced School of Neurochemistry**, Salvador, Novembro, 2023.
- Linalool and its derivatives against Parkinson's and Alzheimer's disease: a review with an experimental approach -**International Symposium on Neurochemistry and Pathophysiology of the Glial Cell and Advanced School of Neurochemistry**, Salvador, Novembro, 2023.
- Mechanisms Involved in the Therapeutic Effect of Cannabinoid Compounds on Gliomas: A Review with Experimental Approach - **International Symposium on Neurochemistry and Pathophysiology of the Glial Cell and Advanced School of Neurochemistry**, Salvador, Novembro, 2023.
- Citronellal and its derivatives against Parkinson's disease and Alzheimer's disease: Review with an experimental approach - **International Symposium on Neurochemistry and Pathophysiology of the Glial Cell and Advanced School of Neurochemistry**, Salvador, Novembro, 2023.
- Antidepressant potential of an eugenol derivative in a murine behavioral model - **International Symposium on Neurochemistry and Pathophysiology of the Glial Cell and Advanced School of Neurochemistry**, Salvador, Novembro, 2023.

### **Orientação de Trabalho de Conclusão de Curso – Farmácia/UFPB:**

- Pires, Hugo Fernandes Oliveira. Estudo não clínico do potencial ansiolítico-símile e da toxicidade do derivado 2-aminotiofênico 7CN03. Departamento de Ciências Farmacêuticas, UFPB, João Pessoa, 2022. 75f.