

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS HUMANAS, LETRAS E ARTES
DEPARTAMENTO DE PSICOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIA COGNITIVA E
COMPORTAMENTO

ANTÔNIA FERNANDES FURTADO DE ABRANTES

INVESTIGAÇÃO DA TOXICIDADE E ATIVIDADE ANTIDEPRESSIVA-SÍMILE
DO *o*-EUGENOL EM CAMUNDONGOS FÊMEAS

JOÃO PESSOA

2024

ANTÔNIA FERNANDES FURTADO DE ABRANTES

**INVESTIGAÇÃO DA TOXICIDADE E ATIVIDADE ANTIDEPRESSIVA-SÍMILE
DO *o*-EUGENOL EM CAMUNDONGOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociência Cognitiva e Comportamento do Centro de Ciências Humanas, Letras e Artes da Universidade Federal da Paraíba para a obtenção do título de doutor em Neurociência Cognitiva e Comportamento.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Mirian Graciela da Silva Stiebbe Salvadori

JOÃO PESSOA

2024

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

A161i Abrantes, Antonia Fernandes Furtado de.
Investigação da toxicidade e atividade
antidepressiva-símile do o-Eugenol em camundongos
fêmeas / Antonia Fernandes Furtado de Abrantes. - João
Pessoa, 2024.
132 f. : il.

Orientação: Mirian Graciela da Silva Stiebbe
Salvadori.
Tese (Doutorado) - UFPB/CCHLA.

1. Depressão. 2. o-Eugenol - atividade
antidepressiva. 3. Dexametasona. 4. Antidepressivos -
mecanismos de ação. 5. avaliação toxicológica. I.
Salvadori, Mirian Graciela da Silva Stiebbe. II. Título.

UFPB/BC CDU 616.89-008.454(043)

ANTÔNIA FERNANDES FURTADO DE ABRANTES

**INVESTIGAÇÃO DA TOXICIDADE E ATIVIDADE ANTIDEPRESSIVA-SÍMILE
DO *o*-EUGENOL EM CAMUNDONGOS**

Tese de doutorado aprovada em 08/11/2024.

BANCA EXAMINADORA

Documento assinado digitalmente
 **MIRIAN GRACIELA DA SILVA STIEBBE SALVADOR**
Data: 11/11/2024 15:40:33-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof.^a Dr.^a Mirian Graciela da Silva Stiebbe Salvadori (Orientadora)
Universidade Federal da Paraíba

Documento assinado digitalmente
 **FLAVIO FREITAS BARBOSA**
Data: 18/11/2024 14:10:36-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Flávio Freitas Barbosa (Membro interno)
Universidade Federal da Paraíba

Documento assinado digitalmente
 **HEMERSON IURY FERREIRA MAGALHAES**
Data: 18/11/2024 18:11:14-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Hemerson Yury Ferreira Magalhães (Membro externo)
Universidade Federal da Paraíba

Documento assinado digitalmente
 **ROSA MARIA MARTINS DE ALMEIDA**
Data: 12/11/2024 09:53:30-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof.^a Dr.^a Rosa Maria Martins de Almeida (Membro externo)
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Documento assinado digitalmente
 **DIOGO VILAR DA FONSECA**
Data: 11/11/2024 10:56:18-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Diogo Vilar da Fonsêca (Membro externo)
Universidade Federal do Vale do São Francisco

À Deus e a minha família que me fortaleceram durante todo o percurso. Também a todos que me apoiaram, contribuíram ou incentivaram a concluir esse projeto.

AGRADECIMENTOS

À Deus, que pela sua bondade e misericórdia me proporcionou a realização dessa conquista e me deu forças ao longo da caminhada. A Ele toda honra e glória.

Ao meu marido e minhas filhas, por estarem sempre ao meu lado, serem pacientes nos momentos difíceis e apoiarem minhas escolhas.

À minha mãe, pai (*in memoriam*) e aos meus irmãos pelo incentivo e encorajamento durante todos os momentos da minha vida.

À minha orientadora, Prof.^a Dr.^a Mirian Graciela da Silva Stiebbe Salvadori, pelo aceite, paciência, disponibilidade, incentivo e toda a orientação que foi essencial para a construção desse trabalho.

Aos funcionários do Biotério Prof. Dr. Thomas George, por todos os serviços prestados e ao fornecimento dos animais para os experimentos realizados por esse estabelecimento.

À UFPB por toda oferta e estrutura para realização desse trabalho e ao Programa de Pós-graduação em Neurociência Cognitiva e Comportamento e seus professores que contribuíram para minha formação.

Ao Prof. Dr. José Maria Barbosa Filho pelo fornecimento da substância testada nesse estudo.

À colaboração dos profissionais do Setor de Histopatologia do Laboratório Multiusuário do DMORF (Departamento de Morfologia) na análise histopatológica, do Laboratório de Ensaio Toxicológicos Não-clínicos e Clínicos (LABETOX) nos testes bioquímicos e hematológicos e do Laboratório Multiusuário de Caracterização e Análise (LMCA) em testes neuroquímicos.

À equipe do laboratório de Psicofarmacologia, em especial a Arthur, Hugo, Mayara, Jaislânia, Beatriz, Larissa, Pablo, Poliane e Humberto, além da Prof.^a Dr.^a Adriana e Allyson do laboratório de Imunologia, pela ajuda na realização dos experimentos ou testes neuroquímicos, os quais foram fundamentais para a realização da pesquisa.

Aos professores das bancas do exame de qualificação e defesa da tese pela disponibilidade e contribuições para a formação deste trabalho.

Aos meus amigos que me incentivaram a continuar e oraram por mim.

A todos aqueles que, embora não tenham sido mencionados, contribuíram e apoiaram a realização desse trabalho em suas diferentes formas.

“Quem tem discernimento está sempre pronto a aprender;
seus ouvidos estão abertos para o conhecimento.”

(Provérbios 18:15)

RESUMO

O transtorno depressivo maior (TDM) é um transtorno mental comum e debilitante, sendo as mulheres quase duas vezes mais propensas a desenvolverem a doença que os homens. As opções de tratamento convencionais possuem efeitos colaterais e eficácia questionável, sendo necessária a busca de novos medicamentos mais eficazes e seguros. O presente estudo investigou parâmetros farmacocinéticos e toxicidade *in silico*, toxicidade aguda e subaguda *in vivo*, e a atividade antidepressiva-símile do *o*-eugenol administrado em doses repetidas, em modelo animal comportamental de depressão induzido por administração repetida de dexametasona em camundongos fêmeas. No estudo *in silico*, foram utilizadas plataformas virtuais pkCSM e SwissADME. Nos estudos *in vivo*, toxicidade aguda e de doses repetidas por via oral foram realizados seguindo os protocolos da *Organisation of Economic Cooperation and Development* (OECD), através da observação de parâmetros comportamentais, ponderais, alimentares, anatomopatológicos, além de hematológicos, bioquímicos na parte subaguda. Na investigação da atividade antidepressiva-símile do *o*-eugenol, por via oral, foram realizados testes comportamentais do nado forçado (TNF), suspensão da cauda (TSC) e preferência pela sacarose (TPS), além do *rota-rod* para avaliar a coordenação motora. Foi estudado o efeito do *o*-eugenol no limiar de convulsões e seu sinergismo com a imipramina, avaliado parâmetros de estresse oxidativo, níveis de IL-1 β e estudo metabolômico pela técnica de ressonância magnética nuclear. Como resultados *in silico*, *o*-eugenol apresentou boa absorção via oral, permeabilidade a barreira hemato encefálica e ao sistema nervoso central, não foi substrato para outros produtos e não apresentou respostas tóxicas nos modelos preditivos. Nos estudos *in vivo*, na toxicidade aguda e de doses repetidas, o *o*-eugenol não promoveu alterações significativas na maioria dos parâmetros investigados. A estimativa da dose aguda letal (DL₅₀) foi de 1000 mg/kg. A partir da triagem farmacológica foi determinado as três doses de *o*-eugenol (25, 50 e 100 mg/kg) utilizadas no estudo. O *o*-eugenol não alterou a coordenação motora dos animais no teste do *rota-rod* ($p > 0,05$). Nos testes TNF e TSC, a dexametasona aumentou o tempo de imobilidade e diminuiu a latência para imobilidade dos camundongos em relação ao controle, enquanto *o*-eugenol e a imipramina diminuíram o tempo de imobilidade e aumentaram a latência para imobilidade em relação a dexametasona ($p < 0,05$). No TPS, a dexametasona diminuiu a preferência à sacarose dos animais, enquanto *o*-eugenol e a imipramina reverteu o comportamento ($p < 0,05$). O *o*-eugenol reduziu a peroxidação lipídica e aumentou os níveis do antioxidante glutationa em estruturas cerebrais, e diminuiu os níveis séricos de IL-1 β ($p < 0,05$). No estudo metabolômico, feito no hipocampo, não houve diferenças importantes entre os grupos pela análise do PCA. O pré-tratamento com *o*-eugenol não diminuiu a latência para a primeira convulsão dos animais que receberam dose subconvulsiva 35mg/kg de pentilenotetrazol ($p < 0,05$) e foi sugestivo uma interação sinérgica entre a imipramina e *o*-eugenol ($p < 0,05$). Assim, os achados demonstraram que o *o*-eugenol apresentou toxicidade relativamente baixa, mostrou efeito semelhante ao antidepressivo imipramina com diminuição do estresse oxidativo em estruturas cerebrais, diminuição dos níveis séricos de IL-1 β , além de também ter efeito sinérgico com a imipramina, mas ser desprovido de efeito adverso pró-convulsivante.

Palavras-chave: *o*-eugenol; depressão; dexametasona; mecanismos de ação; avaliação toxicológica.

ABSTRACT

Major depressive disorder (MDD) is a common and debilitating mental disorder, with women almost twice as likely to develop the disease as men. Conventional treatment options have side effects and questionable efficacy, requiring the search for new, more effective and safer drugs. The present study investigated pharmacokinetic parameters and *in silico* toxicity, acute and subacute toxicity *in vivo*, and the antidepressant-like activity of *o*-eugenol administered in repeated doses, in a behavioral animal model of depression induced by repeated administration of dexamethasone in female mice. In the *in silico* study, pkCSM and SwissADME virtual platforms were used. In the *in vivo* studies, acute and repeated-dose oral toxicity were performed following the protocols of the Organization of Economic Cooperation and Development (OECD), through the observation of behavioral, weight, feeding, anatomopathological, and hematological and biochemical parameters in the subacute part. In the investigation of the antidepressant-like activity of *o*-eugenol, orally, behavioral tests of forced swimming (FST), tail suspension (TST) and sucrose preference (SPT) were performed, in addition to the rota-rod to evaluate motor coordination. The effect of *o*-eugenol on the seizure threshold and its synergism with imipramine were studied, oxidative stress parameters, IL-1 β levels and metabolomic study by nuclear magnetic resonance technique were evaluated. As *in silico* results, *o*-eugenol showed good oral absorption, permeability to the blood-brain barrier and the central nervous system, was not a substrate for other products and did not show toxic responses in predictive models. *In vivo* studies, in acute and repeated dose toxicity, *o*-eugenol did not promote significant changes in most of the parameters investigated. The estimated acute lethal dose (LD₅₀) was 1000 mg/kg. From the pharmacological screening, the three doses of *o*-eugenol (25, 50 and 100 mg/kg) used in the study were determined. The *o*-eugenol did not alter the motor coordination of the animals in the rota-rod test ($p > 0.05$). In the FST and TST tests, dexamethasone increased the immobility time and decreased the latency to immobility of the mice in relation to the control, while *o*-eugenol and imipramine decreased the immobility time and increased the latency to immobility in relation to dexamethasone ($p < 0.05$). In the SPT, dexamethasone decreased sucrose preference of the animals, while *o*-eugenol and imipramine reversed the behavior ($p < 0.05$). The *o*-eugenol reduced lipid peroxidation and increased the levels of the antioxidant glutathione in brain structures, and decreased serum levels of IL-1 β ($p < 0.05$). In the metabolomic study performed in the hippocampus, there were no significant differences between the groups according to PCA analysis. Pretreatment with *o*-eugenol did not decrease the latency to the first seizure in animals that received a subconvulsive dose of 35 mg/kg of pentylenetetrazol ($p < 0.05$) and a synergistic interaction between imipramine and *o*-eugenol was suggested ($p < 0.05$). Thus, the findings demonstrated that *o*-eugenol presented relatively low toxicity, showed an effect similar to the antidepressant imipramine with a decrease in oxidative stress in brain structures, a decrease in serum levels of IL-1 β , and also had a synergistic effect with imipramine, but was devoid of proconvulsant adverse effects.

Keywords: *o*-eugenol; depression; dexamethasone; mechanisms of action; toxicological assessment.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Mecanismos fisiopatológicos do Transtorno Depressivo Maior	25
Figura 2 –	Hipótese monoaminérgica da depressão maior e sinalização de serotonina e norepinefrina no cérebro.....	26
Figura 3 –	A ativação de processos pró-inflamatórios pode influenciar direta ou indiretamente os estados depressivos	29
Figura 4 –	Ativação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) pelo estresse e sua regulação pelo mecanismo de <i>feedback</i> negativo.....	32
Figura 5 –	Estresse oxidativo correlacionado a patogênese e progressão da depressão	34
Figura 6 –	Estrutura do eugenol e o-eugenol	44
Figura 7 –	Fluxograma experimental.....	48
Figura 8 –	Procedimento para o ensaio de toxicidade aguda em dose única com dose inicial de 300 mg/kg de peso corporal.....	50
Figura 9 –	Desenho do estudo de toxicidade aguda.....	51
Figura 10 –	Desenho do estudo de toxicidade subaguda	53
Figura 11 –	Esquema de tratamento dos animais	56
Figura 12 –	Modelo preditivo <i>boiled-eggs</i> para o o-eugenol.....	63
Figura 13 –	Ganho de peso de camundongos, fêmeas, tratadas com a dose de 300 mg/kg de o-eugenol e do controle, após 7 e 14 dias do início do ensaio de toxicidade aguda	67
Figura 14 –	Fotomicrografias do rim, fígado e pulmão dos grupos experimentais do estudo de toxicidade aguda do o-eugenol.....	68
Figura 15 –	Evolução ponderal dos camundongos tratados com o-Eugenol 100 mg/kg e do grupo controle	69
Figura 16 –	Efeito da administração repetida do o-eugenol por 28 dias na coordenação motora pelo Teste do <i>Rotarod</i> em 60 min. após sua administração	70
Figura 17 –	Efeito da administração repetida do o-eugenol por 28 dias no número de cruzamentos (a), <i>rearing</i> (b) e <i>grooming</i> (c) no Teste do Campo Aberto 60 min. após sua administração	70
Figura 18 –	Fotomicrografias de órgãos avaliados dos grupos experimentais do estudo de toxicidade subaguda do o-eugenol	73

Figura 19 – Efeito da administração repetida com dexametasona (32 µg/kg, s.c.) por 8 e 15 dias na (a) latência para imobilidade e (b) tempo de imobilidade no Teste do Nado Forçado (TNF)	74
Figura 20 – Efeito da administração repetida com dexametasona (32 µg/kg, s.c.) por 8 e 15 dias na (a) latência para imobilidade e (b) tempo de imobilidade no Teste da Suspensão da Cauda (TSC).....	75
Figura 21 – Efeito de diferentes doses de <i>o</i> -eugenol em modelo de depressão induzida por doses repetidas de dexametasona (32 µg/kg, s.c.) na (a) latência para imobilidade e (b) tempo de imobilidade no Teste do Nado Forçado (TNF)	76
Figura 22 – Efeito de diferentes doses de <i>o</i> -eugenol em modelo de depressão induzida por doses repetidas de dexametasona (32 µg/kg, s.c.) na (a) latência para imobilidade e (b) tempo de imobilidade no Teste da Suspensão da Cauda (TSC).....	77
Figura 23 – Efeito de diferentes doses de <i>o</i> -eugenol em modelo de depressão induzida por doses repetidas de dexametasona (32 µg/kg, s.c.) no Teste de Preferência por Sacarose (TPS)	78
Figura 24 – Efeito da administração repetida com dexametasona (32 µg/kg, s.c.) por 7 dias, em 4 grupos, na coordenação motora pelo Teste do <i>Rotarod</i> em 60 min. após sua administração	79
Figura 25 – Efeito de diferentes doses de <i>o</i> -eugenol em modelo de depressão induzida por doses repetidas de dexametasona (32 µg/kg, s.c.) no Teste do <i>Rotarod</i> em 60 min. após sua administração	79
Figura 26 – Efeito do <i>o</i> -eugenol em diferentes doses no teste de limite de convulsões induzidas por petilenotetrazol	80
Figura 27 – Efeito da dexametasona (64 µg/kg, s.c.), imipramina (5 e 15 mg/kg), <i>o</i> -eugenol (25 mg/kg) e imipramina (5 mg/kg) + <i>o</i> -eugenol (25 mg/kg) na (a) latência para imobilidade e (b) tempo de imobilidade no Teste do Nado Forçado (TNF)	81
Figura 28 – Efeito de diferentes doses de <i>o</i> -eugenol nos parâmetros relacionados ao estresse oxidativo em modelo de depressão induzida por doses repetidas de dexametasona (32 µg/kg, s.c.): (a) Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS) expresso como mg de malondialdeído (MDA)/g de tecido; (b) Glutathiona Reduzida (GSH) expresso em µg/g de amostra.....	83

Figura 29 – Efeito de diferentes doses de <i>o</i> -eugenol na concentração de IL-1 β no soro de camundongos em modelo de depressão induzida por doses repetidas de dexametasona (32 μ g/kg, s.c.).....	84
Figura 30 – Gráficos de pontuação de PCA obtidos dos dados de espectros de RMN de ^1H das amostras de hipocampo de camundongos que tiveram administração em doses repetidas de dexametasona (32 μ g/kg) e/ou tratamento com imipramina e doses diferentes de <i>o</i> -eugenol.....	85
Figura 31 – Efeitos do <i>o</i> -eugenol no estudo	103

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Parâmetros de Lipinski do <i>o</i> -eugenol	62
Tabela 2 – Parâmetros Farmacocinéticos – Absorção.....	62
Tabela 3 – Parâmetros Farmacocinéticos – Distribuição	63
Tabela 4 – Parâmetros Farmacocinéticos – Metabolismo.....	64
Tabela 5 – Modelos preditivos in silico de potenciais respostas tóxicas do <i>o</i> -eugenol	64
Tabela 6 – Percentual de mortes em 14 dias em diferentes doses do <i>o</i> -eugenol.....	65
Tabela 7 – Efeitos observados do <i>o</i> -eugenol de dose 300 mg/kg na triagem farmacológica comportamental / efeito presente (+), efeito intenso (++), efeito diminuído (-), sem efeito (0).....	65
Tabela 8 – Efeitos observados do <i>o</i> -eugenol de dose 2.000 mg/kg na triagem farmacológica comportamental / efeito presente (+), efeito intenso (++), efeito diminuído (-), sem efeito (0)	66
Tabela 9 – Consumo de água e ração de camundongos, fêmeas, tratadas com <i>o</i> -eugenol na dose de 300 mg/kg durante os 14 dias do ensaio de toxicidade aguda.....	66
Tabela 10 – Consumo de água e ração semanais de grupos de camundongos, fêmeas, tratadas com <i>o</i> -eugenol em doses repetidas de 100 mg/kg durante os 28 dias do ensaio de toxicidade de doses repetidas	69
Tabela 11 – Parâmetros hematológicos obtidos do sangue de camundongos <i>Swiss</i> , fêmeas, tratadas com <i>o</i> -eugenol 100 mg/kg durante os 28 dias consecutivos.....	71
Tabela 12 – Parâmetros bioquímicos obtidos de soro de camundongos <i>Swiss</i> , fêmeas, tratadas com <i>o</i> -eugenol 100 mg/kg durante os 28 dias consecutivos.....	72

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLA

%	Por cento
<	Menor que
=	Igual
>	Maior que
±	Mais ou menos
®	Marca registrada
°C	Graus Celsius
5-HT	Serotonina
AC	Adenililciclase
ACTH	Hormônio Adrenocorticotrópico
ADMET	Absorção, Distribuição, Metabolismo, Excreção e Toxicidade
ADTs	Antidepressivos Tricíclicos
ALT	Alanina Amino Transferase
AMPA	Ácido Alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico
AMPc	Adenosina Monofosfato Cíclico
ANOVA	Análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AST	Aspartato Amino Transferase
AVP	Arginina Vasopressina
BBB	Barreira Hematoencefálica
BDNF	Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro
BHE	Barreira Hematoencefálica
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CHCM	Concentração da Hemoglobina Corpuscular Média
cm	Centrímetro
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
CREB	Proteína de Ligação aos Elementos de Resposta do AMPc
CRH	Hormônio Liberador de Corticotropina
CYP450	Citocromo P450
Da	Dalton
DA	Dopamina
DAG	Diacilglicerol

dl	Decilitro
DL₅₀	Dose Letal Mediana
DSM-5	Manual de Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais Quinta Edição
DTNB	Ácido 5,5-Ditio-Bis-(2-Nitrobenzóico)
e.p.m	Erro padrão da média
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetracético
ERN	Espécies Reativas de Nitrogênio
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
fl	Femtolitros
g	Grama
GABA	Ácido γ -aminobutírico
GHS	Sistema de Classificação Mundial Harmonizado
GR	Receptor Glicocorticóide
GSH	Glutathione Reduzida
GTP	Trifosfato de Guanosina
h	Hora
H	Hidrogênio
HCL	Ácido clorídrico
HCM	Hemoglobina corpuscular média
HIA	Absorção Gastrointestinal
HPA	Hipotálamo-Pituitária-Adrenal
Hz	Hertz
i.p.	Intraperitoneal
IDO	Indoleamina 2,3-dioxigenase
IFNγ	Interferon γ
IFN-γ	Interferon-gama
IL	Interleucina
IMAO	Inibidores da Monoamina Oxidase
iNOS	Óxido Nítrico Sintase Induzível
IP3	Trifosfato de Inositol
ISRS	Inibidor Seletivo de Recaptação de Serotonina
ISRSN	Inibidor Seletivo de Recaptação de Serotonina e da Noradrenalina
K	Kelvin
kg	Quilograma

l	Litro
log	Logaritmo
MAO	Monoamina Oxidase
mg	Miligrama
min.	Minuto
ml	Mililitros
mm	Milímetro
mmol	Milimol
MR	Receptor Mineralocorticóide
ms	Milissegundo
n	Número de animais por grupo
NE	Norepinefrina
NET	Transportador de Noradrenalina
NF-κB	Factor Nuclear Kappa B
nm	Nanômetro
NMDA	<i>N</i> -Metil-D-Aspartato
NO	Óxido nítrico
OECD	<i>Organization for Economic Cooperation and Development</i>
OEs	Óleos essenciais
o-eugenol	Orto-eugenol
OMS	Organização Mundial da Saúde
p38	Uma proteína quinase ativada por mitógeno
PCA	Análise de Componentes Principais
pg	Picograma
PGP	Glicoproteína P
PK	Proteína Cinase
PLC	Fosfolipase C
ppm	Partes por milhão
PTZ	Petilenotetrazol
PVN	Núcleo Paraventricular
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
rpm	Rotação por minuto
RR	<i>Rotarod</i>
s	Segundo

s.c.	Subcutânea
SERT	Transportador de Serotonina
SNA	Sistema Nervoso Autônomo
SNC	Sistema Nervoso Central
SNP	Polimorfismo de Nucleotídeo Único
TBARs	Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico
TDM	Transtorno Depressivo Maior
TNF	Teste do Nado Forçado
TNFα	Fator de Necrose Tumoral α
TPS	Ácido 3-(trimetilsilil) propiônico-2,2,3,3-d4
TPS	Teste da Preferência por Sacarose
TPSA	Área de Superfície Polar Topográfica
TSC	Teste de Suspensão da Cauda
Tween 80	Polioxetileno sorbitano monoleato 80
U	Unidade
v.o.	Via oral
v/v	Volume por volume
VCM	Volume Corpuscular Médio
VDss	Volume de Distribuição no Estado Estacionário
x	Vezes
xg	Força centrífuga
α	Alfa
μg	Micrograma
μl	Microlitros

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	20
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	22
2.1	Aspectos Gerais da Depressão	22
2.2	Fisiopatologia da Depressão	24
2.2.1	Desregulação do sistema monoaminérgico	25
2.2.2	Citocinas pró-inflamatórias na depressão.....	28
2.2.3	Desregulação do Eixo Hipotálamo-Pituitária-Adrenal.....	31
2.2.4	Estresse oxidativo.....	33
2.3.1	Modelo farmacológico com administração de glicocorticóides.....	36
2.3.2	Estudo da toxicidade em modelo não-clínico.....	37
2.4	Tratamento farmacológico da depressão	39
2.5	Plantas medicinais e óleos essenciais	41
2.5.1	<i>o</i> -Eugenol	42
4	OBJETIVOS	45
4.1	Geral	45
4.2	Específicos	45
5	MÉTODOS.....	46
5.1	Local da pesquisa.....	46
5.2	Animais, condições experimentais e aspectos éticos.....	46
5.3	Drogas e preparação	47
5.4	Fluxograma experimental.....	48
5.5	Estudo da toxicidade <i>in silico</i>	49
5.6	Estudo da toxicidade aguda do <i>o</i>-eugenol	49
5.6.1	Triagem farmacológica comportamental.....	51
5.6.2	Consumo de água, alimento e avaliação ponderal	51
5.7	Ensaio toxicológico oral não-clínico de doses repetidas.....	52
5.7.1	Consumo de água, ração e avaliação ponderal.....	53
5.7.2	Avaliação comportamental.....	53
5.7.2.1	Coordenação motora (Teste do <i>Rota-rod</i>).....	53
5.7.3	Atividade locomotora (Teste do Campo aberto)	54
5.7.4	Avaliação laboratorial do sangue	54
5.7.4.1	Parâmetros hematológicos.....	54

5.7.4.2	Parâmetros bioquímicos	55
5.7.5	Exame anatomopatológico	55
5.8	Indução da depressão experimental por administração repetida de dexametasona em camundongos e avaliação do efeito antidepressivo do o-eugenol.....	55
5.8.1	Avaliação do comportamento tipo depressivo	57
5.8.1.1	Teste do nado forçado (TNF)	57
5.8.1.2	Teste de Suspensão da Cauda (TSC).....	57
5.8.1.3	Teste da Preferência por Sacarose (TPS)	57
5.8.2	Avaliação da coordenação motora pelo <i>rota-rod</i>	58
5.9	Teste de limite de convulsões induzidas por pentilenotetrazol.....	58
5.10	Sinergismo do o-eugenol com a imipramina	58
5.11	Ensaio neuroquímico.....	59
5.11.1	Determinação de parâmetros de estresse oxidativo.....	59
5.11.1.1	Determinação do nível de peroxidação lipídica	59
5.11.1.2	Determinação da concentração de glutathione reduzida (GSH).....	59
5.11.2	Determinação dos níveis de IL-1 β	60
5.11.3	Metabolômica por ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H	60
5.12	Gravação e análise dos vídeos	61
5.13	Análise estatística	61
6	RESULTADOS	62
6.1	Estudo da toxicidade <i>in silico</i>	62
6.2	Estudo da toxicidade aguda.....	64
6.2.1	Estimativa da Dose Letal.....	64
6.2.2	Efeitos na triagem farmacológica comportamental do o-eugenol.....	65
6.2.3	Consumo de água, ração e avaliação ponderal.....	66
6.2.4	Exame anatomopatológico	67
6.3	Ensaio toxicológico não-clínico de doses repetidas	69
6.3.1	Consumo de água, ração e avaliação ponderal.....	69
6.3.2	Avaliação comportamental.....	70
6.3.2.1	Teste do <i>Rota-rod</i>	70
6.3.2.2	Campo aberto	70
6.3.3	Avaliação laboratorial do sangue	71
6.3.3.1	Parâmetros hematológicos.....	71

6.3.3.2	Parâmetros bioquímicos	71
6.3.4	Exame anatomopatológico	72
6.4	Análise farmacológica e comportamental do <i>o</i>-eugenol	74
6.4.1	Indução de depressão experimental por administração repetida de dexametasona em camundongos fêmeas	74
6.4.2	Efeito do <i>o</i> -eugenol no Teste do Nado Forçado (TNF).....	75
6.4.3	Efeito do <i>o</i> -eugenol no Teste de Suspensão da Cauda (TSC).....	76
6.4.4	Efeito do <i>o</i> -eugenol no Teste de Preferência por Sacarose (TPS)	78
6.4.5	Efeito do <i>o</i> -eugenol no Teste do <i>Rota-rod</i>	78
6.5	Teste de limite de convulsões induzidas por pentilenotetrazol.....	80
6.6	Sinergismo do <i>o</i>-eugenol com a imipramina	80
6.7	Ensaio neuroquímico.....	82
6.7.1	Determinação de parâmetros de estresse oxidativo.....	82
6.7.2	Determinação dos níveis de IL-1 β	83
6.7.3	Metabolômica por ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H	84
7	DISCUSSÃO	86
8	CONCLUSÕES	103
	REFERÊNCIAS	105
	ANEXO A – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA.....	132
	ANEXO B – PROTOCOLO EXPERIMENTAL DA TRIAGEM	
	FARMACOLÓGICA COMPORTAMENTAL	133

1 INTRODUÇÃO

Os distúrbios depressivos têm atingido cada vez mais as pessoas, levando a uma série de consequências desfavoráveis com relevância médica e sociológica, afetando significativamente a qualidade de vida e a capacidade adaptativa dos indivíduos (Shadrina et al., 2018). Segundo a Organização Mundial de Saúde, o número total de pessoas no mundo com depressão é de 322 milhões, correspondendo a uma proporção da população global de 4,4%. O Brasil encontra-se na quinta posição no *ranking* mundial, estima-se que 5,8% da população nacional é afetada pela depressão (World Health Organization, 2017). Entretanto, um aumento significativo de transtorno depressivo maior durante o ano de 2020 foi observado como resultado da pandemia de COVID-19, associados ao aumento das taxas de infecção por SARS-CoV-2 e à diminuição da mobilidade humana (Santomauro et al., 2021; Taquet et al., 2021).

O Transtorno Depressivo Maior (TDM), um dos transtornos mentais mais comuns, envolve sintomas como humor deprimido, perda de interesse e prazer e sensação de cansaço. A etiologia e progressão desse transtorno são mediadas por uma interação complexa entre fatores genéticos, biológicos, epigenéticos e ambientais (Dean & Keshavan, 2017; Duman et al., 2016; Keers & Uher, 2012). O transtorno em si possui vários mecanismos fisiopatológicos, como a deficiência de monoaminas, anormalidades do eixo HPA, aumento de citocinas e diminuição da neurogênese e neuroplasticidade. Além disso, eventos estressantes ou traumáticos e a vulnerabilidade genética podem ajudar para o desenvolvimento da doença (Dean & Keshavan, 2017; Duman et al., 2016).

Os modelos animais desempenham um papel importante na investigação de mecanismos responsáveis pela etiologia e tratamento da depressão maior e na verificação da eficácia de um amplo espectro de antidepressivos para atender a demandas da indústria farmacêutica para a triagem de novos compostos (Czéh et al., 2016). Eles foram desenvolvidos aplicando diferentes abordagens metodológicas, como fatores estressantes ou manipulações genéticas, que desencadearam o aparecimento do fenótipo do tipo depressivo em roedores (Becker et al., 2021). Modelos atuais têm consistido em expor os animais a administração exógena de glicocorticóides para mimetizar o estresse crônico (Becker et al., 2021; Planchez et al., 2019), onde a administração de dexametasona ou de corticosterona produziu comportamentos semelhantes à depressão em modelos animais (Fraga et al., 2021; Lopes et al., 2018; Mesripour & Rakhshankhah, 2021; Wu et al., 2021).

Apesar de vários medicamentos disponíveis, as altas taxas de resposta parcial ou nenhuma resposta e o início tardio dos efeitos das terapias antidepressivas deixam muitos paci-

entes tratados inadequadamente, tornando o tratamento contemporâneo não totalmente eficaz e praticamente limitado a aliviar os sintomas da doença (Curtin et al., 2016; Duman, 2018; Fajemiroye et al., 2016; Gaynes et al., 2009; Herbet et al, 2019). Logo, levando em consideração a patogênese, é fundamental identificar novos medicamentos com alta eficácia e segurança (Duman et al., 2016; Levy et al., 2018; Wang et al., 2018).

As plantas medicinais são ricas em vários compostos fitoquímicos que têm papéis farmacológicos no tratamento de várias doenças. Dessa forma, elas possuem grande potencial como fonte de novas moléculas. Compostos importantes que atuam no sistema nervoso central (SNC) foram isolados de espécies de plantas. Um grande número desses compostos é constantemente estudado, testado e usado, em sua forma natural ou modificado, para o tratamento da depressão (Fajemiroye et al., 2016; Martins & Sukumaran, 2018). Em relação aos óleos essenciais dessas plantas, as duas classes de compostos principais que apresentaram efeitos antidepressivos são os terpenóides e fenilpropanóides (Fonseca et al., 2023). O eugenol, um fenilpropanóide, é frequentemente encontrado em óleos essenciais em uma ampla gama de espécies de plantas, como *Eugenia caryophyllata* e *Cinnamomum loureioi*, e seu papel na neuroproteção e em doenças do SNC envolve vários mecanismos, incluindo proteção de danos resultantes do estresse oxidativo, anti-inflamatório e regulação da liberação de neurotransmissores, como a serotonina e norepinefrina (Nisar et al., 2021).

O *o*-eugenol (orto-eugenol), análogo do eugenol e ainda pouco estudado, já apresentou uma relevante atividade antidepressiva símile por meio dos receptores dopaminérgicos D1 e α 1-adrenérgicos em animais submetidos ao modelo estresse agudo induzido pela dexametasona (Araújo, 2018), além de atividade antinociceptiva, anti-inflamatória (Fonsêca et al., 2016), ansiolítica e antioxidante (Godoy et al., 2023). Assim, o presente estudo objetivou dar continuidade a investigação da atividade antidepressiva do *o*-eugenol e avaliar a sua toxicidade aguda e subaguda em animais.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Aspectos Gerais da Depressão

Transtorno mental é uma síndrome que se caracteriza por perturbação clinicamente significativa na cognição, na regulação emocional ou no comportamento de um indivíduo que reflete uma disfunção nos processos psicológicos, biológicos ou de desenvolvimento subjacentes ao funcionamento mental (American Psychiatric Association, 2014). A depressão é um transtorno mental grave que está se tornando mais comum e crescente (Antunes et al., 2016; Dean & Keshavan, 2017; Możdżeń et al., 2017; Shadrina et al., 2018). Ela pode diminuir a qualidade de vida e causar declínio na capacidade de realizar até mesmo as tarefas diárias mais simples (Fekadu et al., 2017; Shadrina, et al., 2018), se tornando um grande problema de saúde com alta prevalência e um pesado fardo socioeconômico nas sociedades ocidentais (Levy et al., 2018). Além de sua natureza crônica, os sintomas associados a esse transtorno mental costumam ser recorrentes e fatais (Fekadu et al., 2017). Em sua forma mais grave, a depressão pode levar ao suicídio (Możdżeń et al., 2017; Martins & Sukumaran, 2018).

Embora ela possa afetar pessoas de todas as idades e ocorra em um nível mais baixo em crianças e adolescentes do que os grupos de idade mais avançada, o risco de ficar deprimido é aumentado pela pobreza, desemprego, eventos da vida como a morte de um ente querido ou o rompimento de um relacionamento, doenças físicas e problemas causados pelo uso de álcool e drogas. É mais comum a depressão em mulheres (5,1%) do que homens (3,6%) (World Health Organization, 2017), sendo as mulheres quase duas vezes mais propensas a sofrer de depressão maior do que os homens. A diferença de gênero nas taxas de depressão com a maior incidência nas mulheres começa a se desenvolver no meio da puberdade, e essa porcentagem típica já é atingida no final da adolescência, se mantendo até a velhice (Kuehner, 2017). As flutuações dos esteróides gonadais (ou seja, estrogênio e progesterona) associadas ao ciclo de vida reprodutivo (puberdade, ciclo menstrual, parto e menopausa) contribuem para a vulnerabilidade à depressão (Bloch et al., 2003). Além de fatores hormonais, essa diferença de gênero pode estar relacionada a fatores genéticos, resposta fisiológica ao estresse e fatores ambientais (Kuehner, 2017).

De acordo com a *American Psychiatric Association* (2014), através do Manual de Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais quinta edição (DSM-5), os transtornos depressivos incluem: transtorno disruptivo da desregulação do humor – caracterizado por explosões de raiva recorrentes e graves manifestadas pela linguagem e/ou pelo comportamento conside-

radas desproporcionais em intensidade ou duração à situação ou provocação; transtorno depressivo maior – indicado por presença de humor deprimido ou perda de interesse ou prazer que deve estar associados a quatro ou mais sintomas presentes durante o mesmo período de duas semanas; transtorno depressivo persistente (distímia) – tem como característica essencial o humor deprimido que ocorre na maior parte do dia, na maioria dos dias, por pelo menos dois seguida pela presença, enquanto deprimido, de duas ou mais características que não satisfazem os critérios para um transtorno depressivo maior; transtorno disfórico pré-menstrual – caracterizado por expressão de labilidade do humor, irritabilidade, disforia e sintomas de ansiedade que ocorrem repetidamente durante a fase pré-menstrual do ciclo e remitem por volta do início da menstruação ou logo depois; transtorno depressivo induzido por substância/medicamento – incluem os sintomas de um transtorno depressivo, como o transtorno depressivo maior; entretanto, abstinência está associada a ingestão, injeção ou inalação de uma substância; transtorno depressivo devido à outra condição médica – caracterizado por um período persistente de humor deprimido ou diminuição acentuada de interesse ou prazer em que é considerado relacionado aos efeitos fisiológicos diretos de outra condição médica; transtorno depressivo não especificado – quando os critérios para um transtorno depressivo específico não são satisfeitos ou não há informações suficientes para fazer um diagnóstico mais específico.

Outra distinção, feita pela Organização Mundial de Saúde, diz respeito à depressão em pessoas com ou sem história de episódios maníacos. O transtorno afetivo bipolar geralmente consiste em episódios maníacos e depressivos separados por períodos de humor normal. Os episódios maníacos envolvem humor elevado e aumento de energia, resultando em atividade excessiva, pressão da fala e diminuição da necessidade de sono (World Health Organization, 2017).

O transtorno depressivo maior é um dos distúrbios psiquiátricos mais prevalentes e debilitantes (Dean & Keshavan, 2017). De acordo com a *American Psychiatric Association* (2014), em seu Manual de Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais quinta edição (DSM-5), ele representa a condição clássica do grupo de transtornos depressivos e para critérios diagnósticos, o humor deprimido ou perda de interesse ou prazer (anedonia) devem ser acompanhados por pelo menos quatro das seguintes manifestações: perda ou ganho significativo de peso, insônia ou hipersonia, agitação ou retardo psicomotor, fadiga ou perda de energia, sentimentos de inutilidade ou culpa, capacidade diminuída de concentração ou tomada de decisões e pensamentos recorrentes de morte ou ideação suicida.

Para um melhor tratamento dos pacientes que sofrem desta doença, a elucidação dos mecanismos psicopatológicos subjacentes e neurobiológicos da depressão são necessários (Antunes et al., 2016). Apesar do desenvolvimento de vários medicamentos para o tratamento da depressão, as opções de tratamento convencionais são prejudicadas por efeitos colaterais, adversos, eficácia questionável e questões de segurança (Fekadu et al., 2017; Rahman et al., 2017).

2.2 Fisiopatologia da Depressão

Mesmo com grande significado médico e social, além do progresso na pesquisa em neurociência, os transtornos depressivos, principalmente o Transtorno Depressivo Maior, possuem uma compreensão ainda incompleta da fisiopatologia, por não possuírem uma conceituação melhor definida para explicar as causas e os mecanismos do seu desenvolvimento dado a sua heterogeneidade clínica (Dean & Keshavan, 2017; Duman et al., 2016; Erjavec et al., 2020; Herbert et al., 2019; Oakes et al., 2017; Shadrina, et al., 2018). Várias teorias foram sugeridas para explicar o início da depressão e foram confirmadas por estudos bioquímicos, imunológicos e fisiológicos (Shadrina, et al., 2018). Entre os mecanismos fisiopatológicos, incluem desequilíbrio dos sistemas neurotransmissores, níveis alterados de óxido nítrico, resposta inflamatória e o estresse oxidativo, desregulação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) e estresse, e desequilíbrio na liberação de fatores neurotróficos (Dean & Keshavan, 2017; Erjavec et al., 2020; Ghasemi, 2019; Liu et al., 2015; Tomaz et al., 2020) (Figura 1). Além disso, fatores ambientais (Dean & Keshavan, 2017; Levy et al., 2018), genéticos e epigenéticos têm contribuído para o desenvolvimento da depressão (Duman et al., 2016; Shadrina, et al., 2018). Muitas doenças somáticas crônicas, como doença cardíaca coronária e diabetes *mellitus* tipo 2, estão frequentemente associadas a dor, medo, incapacidade e diminuição da qualidade de vida que podem piorar o curso da depressão (Halaris, 2017).

Embora os vários mecanismos biológicos implicados na depressão possam parecer não relacionados, indicando que o Transtorno Depressivo Maior pode na verdade representar várias doenças biologicamente distintas, todas essas vias estão relacionadas e interconectadas. Focar em um fator biológico isolado pode perder totalmente a verdadeira natureza da depressão como uma doença na qual esses diferentes fatores interagem e estimulam uns aos outros (Dean & Keshavan, 2017). Uma compreensão mais completa da depressão depende de estudos futuros, em que modelos animais adequados para identificar as vias intracelulares envolvidas no mecanismo desse complexo transtorno psiquiátrico podem levar nosso conhecimento adiante (Możdżeń et al., 2017). A depressão é mais frequentemente conceituada como uma

doença sistêmica e não é de se admirar que existam biomarcadores potenciais da depressão em tantos sistemas biológicos diferentes (Erjavec et al., 2020).

Figura 1 – Mecanismos fisiopatológicos do Transtorno Depressivo Maior.



A seguir elencamos os principais mecanismos fisiopatológicos da depressão, relacionados ao presente estudo, de forma mais detalhada.

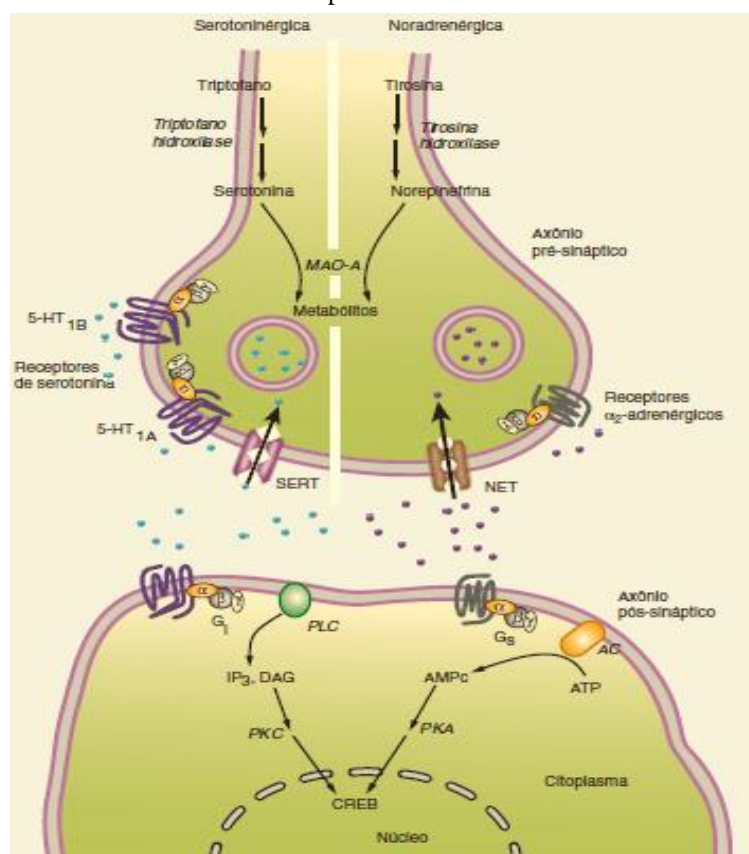
2.2.1 Desregulação do sistema monoaminérgico

Uma das principais hipóteses para a fisiopatologia da depressão, a hipótese das monoaminas, postula que a depressão é causada por uma alteração nos níveis ou função de uma ou mais das monoaminas, incluindo serotonina (5-HT), norepinefrina (NE) e dopamina (DA) (Dean & Keshavan, 2017; Fasipe, 2019) (Figura 2). A serotonina controla a sensação de fome, apetite, impulso para agir, violência, impulsividade, ansiedade, medo, capacidade de pensar com clareza, percepção e outras. A noradrenalina promove a vigilância, aumentando a excitação e o estado de alerta, como também melhora a formação e recuperação da memória. A dopamina possui função principalmente no controle motor, comportamento motivado por recompensa e na liberação de vários hormônios além de outras funções (Young & Leyton, 2002). Porém, a serotonina, norepinefrina e dopamina não operam isoladamente, mas esses sistemas de neurotransmissores estão integralmente interconectados (Dean & Keshavan, 2017).

Em meados do século XX, a observação de que o anti-hipertensivo reserpina poderia induzir uma síndrome semelhante à depressão por reduzir a quantidade de monoaminas des-

pertou interesse no potencial papel dos neurotransmissores monoaminas na patogênese do transtorno depressivo maior. A hipótese de déficit de monoamina foi apoiada por dados que mostraram que os inibidores de monoamina oxidase são antidepressivos eficazes e pareciam funcionar aumentando a neurotransmissão de monoaminas (Segal et al., 1974). Posteriormente, foi mostrado que o esgotamento do triptofano dietético foi suficiente para induzir a depressão em pacientes com histórico familiar de transtornos de humor sugerindo que um déficit de serotonina como um fator etiológico em transtornos depressivos maiores (Benkelfat et al., 1994). Posteriormente, metabólitos da serotonina foram encontrados reduzidos em pacientes diagnosticado com depressão maior e antidepressivos, como antidepressivos tricíclicos, seletivos inibidores da recaptação da serotonina e inibidores da recaptação da serotonina-norepinefrina mostraram aumentar os níveis de serotonina no cérebro (Dean & Keshavan, 2017) (Figura 2).

Figura 2 – Hipótese monoaminérgica da depressão maior e sinalização de serotonina e norepinefrina no cérebro.



Fonte: Adaptado de Belmaker & Agam (2008).

Legenda: AC, adenililciclase; 5-HT, serotonina; CREB, proteína de ligação aos elementos de resposta do AMPc; DAG, diacilglicerol; IP₃, trifosfato de inositol; MAO, monoaminoxidase; NET, transportador de norepinefrina; PK, proteína-cinase; PLC, fosfolipase C; SERT, transportador de serotonina.

A teoria das monoaminas foi depois ampliada para enfatizar o papel da diminuição da neurotransmissão dopaminérgica na mediação de anedonia, motivação e sintomas cognitivos na depressão (Dunlop & Nemeroff, 2007). O fato de que os agentes antidepressivos como a bupropiona aumentam a dopamina, os níveis cerebrais do neurotransmissor fornecem evidências indiretas do papel da dopamina na regulação do humor (Watt & Panksepp, 2009).

Na hipótese das monoaminas, a deficiência funcional das monoaminas observadas na depressão pode ocorrer através da metabolização excessiva desses neurotransmissores pela enzima monoamina oxidase (MAO). A MAO regula os níveis de monoaminas e um aumento de sua atividade pode levar a uma diminuição da concentração de monoaminas no SNC, o que pode contribuir para a patogênese da depressão (Alawie et al., 2020). A deficiência funcional das monoaminas também pode ser resultado da diminuição das funções de proteínas de transporte e anormalidades na função do receptor do neurotransmissor. As proteínas de transporte, no cérebro, facilitam a recaptação pré-sináptica de neurotransmissores para que eles estejam disponíveis para neurotransmissão contínua e reduzem a disponibilidade de neurotransmissores na fenda sináptica, diminuindo a extensão da degradação dos neurotransmissores por enzimas monoaminas oxidase (Brigitta, 2002). Dessa forma, a redução do número e/ou função dessas proteínas poderia contribuir para menores níveis de monoaminas vistos na depressão (Jesulola et al., 2018). Além disso, pode existir um mau funcionamento do controle de *feedback* da liberação através dos autorreceptores reguladores pré-sinápticos (Belmaker & Agam, 2008).

Já as alterações nas funções dos receptores pós-sinápticos podem resultar em um acoplamento de neurotransmissores-receptores prejudicado, geralmente devido à diminuição da afinidade receptora aos neurotransmissores ou diminuição do número de receptores, ou ainda podem resultar em mudanças na cascata de transdução de sinal que causam transmissão ineficaz ou anormal (Brigitta, 2002), com níveis reduzidos de adenosina monofosfato cíclico (AMPC), inositol e da proteína de ligação ao elemento de resposta ao AMPC (CREB), um fator de transcrição necessário para ativar a transcrição de genes que regulam o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) (Belmaker & Agam, 2008). O BDNF é uma neurotrofina envolvida no crescimento, diferenciação e sobrevivência dos neurônios e que também demonstrou ser importante na regulação da neurogênese e da plasticidade sináptica (Lu et al., 2014).

No entanto, um aspecto importante que limita a teoria monoaminérgica é o fato de que, embora os antidepressivos possam aumentar os níveis de monoaminas de forma quase imediata, os efeitos terapêuticos geralmente só se manifestam após algumas semanas de uso

contínuo. Isso sugere que o simples aumento de monoaminas não é suficiente para explicar completamente os efeitos clínicos observados na prática, sendo necessário considerar outras vias e mecanismos mais amplos e complexos (Dean & Keshavan, 2017; Duman et al., 2021; Fajemiroye et al., 2016; Hamon & Blier, 2013).

Tem sido observado nos últimos anos que além das monoaminas, outros neurotransmissores, como o glutamato e o ácido γ -aminobutírico (GABA), parecem ser importantes na fisiopatologia e no tratamento da depressão (Erjavec et al., 2020). Glutamato e GABA são neurotransmissores excitatório e inibitório, respectivamente, e os agentes direcionados aos seus sistemas possuem particular relevância clínica, pois apresentam resposta rápida em relação aos antidepressivos convencionais (Ragguett et al., 2019). Níveis diminuídos de GABA foram observados no plasma de indivíduos com depressão (Petty et al., 1995) e estudos de imagem detectaram também concentrações reduzidas de GABA em áreas corticais do cérebro de indivíduos deprimidos e sua normalização com remissão (Godfrey et al., 2018). Enquanto que, um aumento no glutamato pode ser prejudicial aos neurônios e, muitas vezes, está associado à inflamação e ao estresse (Hei et al., 2019; Pitsillou et al., 2020). Esse acúmulo de glutamato pode levar à superativação dos receptores de glutamato ionotrópicos, excitotoxicidade, bem como produzir alterações estruturais (Lewerenz & Maher, 2015). O receptor ionotrópico *N*-metil-D-aspartato (NMDA) tem sido associado aos mecanismos de ação de antidepressivos de ação rápida, como a cetamina que corresponde a um antagonista deste receptor (Pitsillou et al., 2020; Reddy-Thootkur et al., 2020).

2.2.2 Citocinas pró-inflamatórias na depressão

O sistema imunológico pode afetar o SNC através de citocinas, interferindo em sistemas biológicos que estão associados à fisiopatologia da depressão (Jeon & Kim, 2016; Nettis & Pariante, 2020).

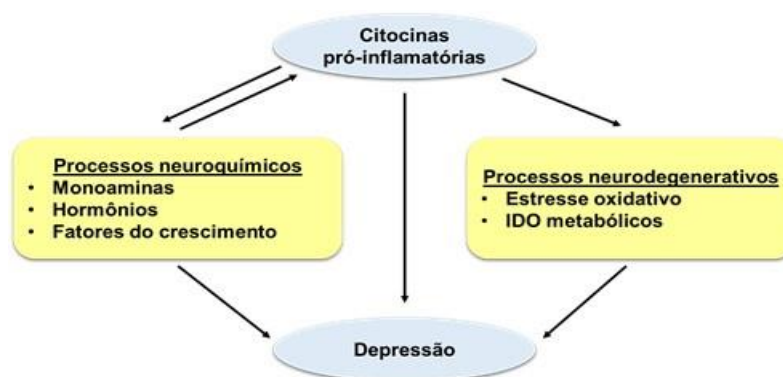
As citocinas constituem uma classe heterogênea de mediadores produzidos como reguladores da resposta imune por células imunocompetentes, como linfócitos e macrófagos (Shadrina, et al., 2018). No SNC, circulam poucas células imunes transmitidas pelo sangue, pois a barreira hematoencefálica (BHE) restringe a migração de leucócitos para o SNC. Porém, também é conhecido que as citocinas podem ser produzidas por células residentes do SNC, como micróglia, astrócitos e células endoteliais vasculares e fibroblastos, e que esse sistema é particularmente vulnerável a redes de citocinas desreguladas (Becher et al., 2017).

As citocinas podem ser classificadas em dois grupos: citocinas pró-inflamatórias que estão diretamente ou indiretamente envolvidas no processo inflamatório e inclui a interleucina 1 (IL-1), IL-2, IL-6, IL-12, interferon γ (IFN γ) e fator de necrose tumoral α (TNF α); e anti-inflamatórias que suprimem a resposta imune e, portanto, evitam a ativação celular e a produção de moléculas pró-inflamatórias, incluindo IL-4, IL-10 e IL-13. Algumas citocinas, de acordo com sua concentração exercem funções pró e anti-inflamatórias como a IL-8 (Shadri-na, et al., 2018).

O sistema imunológico afeta o SNC através de citocinas, que regulam as atividades cerebrais e as emoções. As citocinas afetam dois sistemas biológicos que estão mais associados à fisiopatologia da depressão: o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal e o sistema catecolamina/sistema nervoso simpático. A neuroinflamação e as citocinas afetam os padrões de sinais cerebrais envolvidos na psicopatologia da depressão e nos mecanismos dos antidepressivos, e estão associadas à neurogênese e à plasticidade neural.

A ativação de processos pró-inflamatórios pode influenciar direta ou indiretamente os estados depressivos. Elevações de citocinas podem influenciar a atividade da monoamina (por exemplo, 5-HT, NE), hormônio (por exemplo, CRH) e fator de crescimento (por exemplo, BDNF), o que pode favorecer a evolução da depressão (e o funcionamento hormonal e neuroquímico basal podem impactar os processos de citocinas). Alternativamente, variações de citocinas podem estimular a enzima indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO) e promover a liberação de metabólitos neurotóxicos, incluindo ácido quinurênico, ácido quinolínico ou 3-hidroxiquinurenina (Audet et al., 2014) (Figura 3).

Figura 3 – A ativação de processos pró-inflamatórios pode influenciar direta ou indiretamente os estados depressivos.



Fonte: Adaptado de Audet et al. (2014).

Quantidades excessivas de citocinas pró-inflamatórias podem causar alterações estruturais e funcionais dos neurônios levando ao desenvolvimento de depressão (Erjavec et al., 2020; Komori, 2017). De fato, a inflamação crônica de baixo grau pode contribuir para o comprometimento serotoninérgico, noradrenérgico e dopaminérgico observado no TDM (Miller & Raison, 2016). Estressores psicológicos e sociais também podem aumentar os níveis de citocinas inflamatórias em humanos, e infusões de citocinas, como o interferon, podem produzir comportamento do tipo depressivo (Iwata et al., 2013).

As citocinas pró-inflamatórias estimulam o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal para induzir níveis aumentados de glicocorticóides e diminuir a sensibilidade dos receptores de glicocorticóides, resultando em resistência aos glicocorticóides. Portanto, a imunidade celular é aumentada e um círculo vicioso é iniciado no qual as citocinas pró-inflamatórias são aumentadas (Jeon & Kim, 2016). A ativação do fator nuclear NF- κ B, o principal fator de transcrição envolvido na iniciação da resposta inflamatória, além de induzir a produção de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β e TNF α , também induz uma superexpressão da sintase do óxido nítrico induzível (iNOS), o que leva a um grande aumento dos níveis de óxido nítrico (NO) que contribui para a síntese espécies reativas de oxigênio (ERO), o que resulta em neurotoxicidade e neurodegeneração (Inserra et al., 2019). Além disso, o NO interfere na produção de monoaminas e no transporte pré-sináptico, diminuindo a disponibilidade de aminas inter-sinápticas (Sandor et al., 1995).

Logo, as respostas inflamatórias também são acompanhadas por estresse oxidativo. Metanálises recentes revelaram que o estresse oxidativo tem um lugar importante na neurobiologia da depressão, e o cérebro humano é vulnerável ao estresse oxidativo (Liu et al., 2015). Existem evidências de que a presença de espécies reativas de oxigênio (ERO), espécies reativas de nitrogênio (ERN) e níveis reduzidos de antioxidantes e enzimas antioxidantes estão envolvidos na fisiopatologia da depressão (Maes et al., 2011).

Elevações nos níveis de TNF- α podem causar reduções de plasticidade sináptica neuronal, fatores neurotróficos e neurogênese (Hashmi et al., 2013). Também existem estudos genéticos que tratam do papel dos polimorfismos de seu gene na etiologia da depressão (Erjavec et al., 2020). Outras citocinas pró-inflamatórias, IL-6 e IL-1 β , participam da promoção e manutenção dos sintomas depressivos (Maes et al., 2009). O nível de IL-6 plasmático é diferente em vários subtipos de depressão (Erjavec et al., 2020), enquanto que, níveis de IL-1 β correlacionaram-se com a gravidade da depressão (Zou et al., 2018).

Observações clínicas sugerem que existe uma relação estreita entre as citocinas pró-inflamatórias e a depressão maior (Komori, 2017; Tomaz et al., 2020). Concentração plasmática elevada das citocinas pró-inflamatórias interleucina IL-1 β , IL-6 e TNF- α foram encontrados em pacientes deprimidos, e os níveis de citocinas foram normalizados pelo tratamento

antidepressivo (Dowlati et al., 2010). Porém, os níveis médios de citocinas no plasma são elevados apenas ligeiramente em pacientes com depressão em comparação com pessoas saudáveis (Shadrina, et al., 2018). E também existem casos em que pacientes depressivos podem ter níveis normais de citocinas, podendo estar relacionada a diferentes subtipos de depressão ou a variações individuais na resposta imunológica (Dantzer et al., 2008).

2.2.3 Desregulação do Eixo Hipotálamo-Pituitária-Adrenal

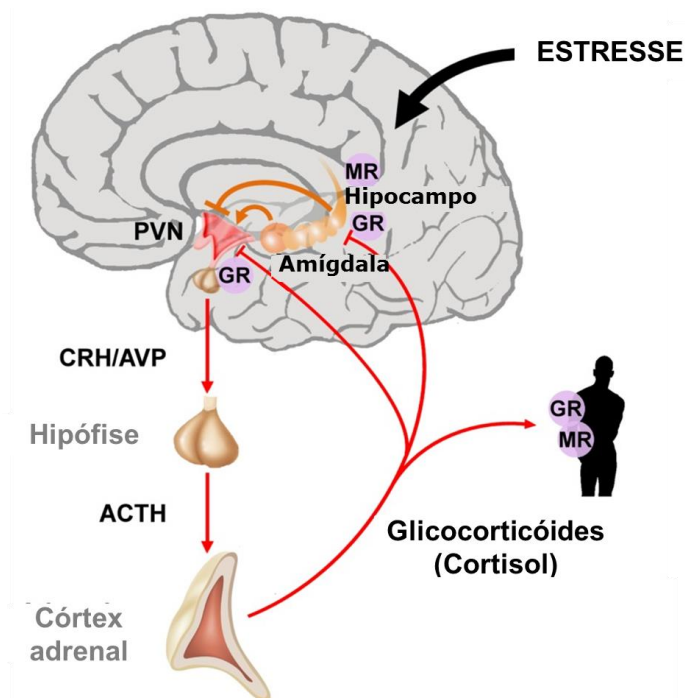
O estresse pode iniciar processos cognitivos e biológicos que aumentam o risco de transtorno depressivo (Herbet et al, 2019). A disfunção do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA), principal sistema de resposta ao estresse, é importante na patogênese da depressão (Erjavec et al., 2020, Li et al., 2017).

O eixo HPA possui três componentes principais: células neurosecretores hipotalâmicas, glândula pituitária e córtex adrenal. Esses componentes são responsáveis pela adaptação às condições ambientais alteradas e pela mobilização das reservas do organismo durante a exposição ao estresse de diferentes etiologias (Shadrina, et al., 2018).

Em resposta ao estresse, os neurônios nos núcleos paraventriculares hipotalâmicos secretam hormônio liberador de corticotropina (CRH), que exerce sua ação na hipófise e promove liberação do hormônio adrenocorticotrópico (ACTH) (Figura 4). O ACTH atua no córtex adrenal e esta produz hormônios glicocorticóides (cortisol para humanos e corticosterona para roedores) (Schiavone et al., 2013). Os glicocorticóides interagem com seus receptores em múltiplos tecidos-alvo, incluindo o eixo HPA, onde são responsáveis pela inibição por *feedback* negativo da secreção do CRF e ACTH a partir do hipotálamo, mediada por dois subtipos distintos de receptores intracelulares referidos como receptor de mineralocorticóide (RM) e receptor de glicocorticóide (RG). (Mesripour et al., 2019; Pariante et al., 2001; Raabe & Spengler, 2013).

Porém, o eixo HPA hiperativo está geralmente associado à liberação aumentada dos níveis de ACTH e cortisol (Nandam et al., 2020; Strawbridge et al., 2015; Jia et al., 2019). Um aumento no nível de cortisol seria um sinal para que o hipotálamo e a hipófise parem de produzir hormônios. Entretanto, em indivíduos deprimidos, o hipotálamo pode influenciar continuamente a hipófise para produzir ACTH, independentemente dos níveis de cortisol (Herbet et al, 2019). Além disso, o eixo HPA hiperativo está também associado ao desequilíbrio na inibição de *feedback* negativo pelo cortisol mediado via MR e GR no eixo HPA (Strawbridge et al., 2015). Porém, quando os níveis endógenos de glicocorticóides são elevados, acredita-se que o RG seja mais importante na regulação da resposta ao estresse (Alheira & Brasil, 2005; Mesripour et al., 2019; Pariante et al., 2001).

Figura 4 – Ativação do Hipotálamo-Pituitária-Adrenal (HPA) pelo estresse e sua regulação pelo mecanismo de *feedback* negativo.



Fonte: Adaptado de Raabe & Spengler (2013).

Nota: O eixo hipotálamo-pituitária-adrenal integra e medeia a resposta ao estresse no início da vida e, posteriormente, na adversidade. A percepção de ameaças físicas e sociais reais e/ou presumidas causa ativação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal. Os estados de ansiedade surgem da ativação da amígdala e aumentam a resposta ao estresse por meio de projeções neuronais para o núcleo paraventricular (PVN). O hipocampo desempenha um papel importante na avaliação de estressores e como um local de regulação de *feedback* negativo mediado pelo receptor de glicocorticóide (GR). A liberação do hormônio liberador de corticotrofina (CRH) e arginina vasopressina (AVP) promove a síntese e secreção de adrenocorticotrofina (ACTH). O ACTH, por sua vez, estimula a liberação de glicocorticóides pelas glândulas supra-renais. Esses hormônios circulam por todo o corpo e pelo cérebro e se ligam aos receptores esteroides nucleares intracelulares. Os receptores mineralocorticóides hipocâmpais (MR) atuam no início da resposta ao estresse, enquanto o GR no hipocampo, PVN e pituitária anterior encerra a resposta ao estresse.

Os níveis aumentados de cortisol prejudicam a capacidade do hipocampo de se adaptar a uma mudança do ambiente, alteram conexões no cérebro que lidam com o processamento da emoção e adaptação (Dean & Keshavan, 2017). Cortisol diurno elevado e uma prevalência mais alta de resistência aos glicocorticóides foram detectados em pacientes com depressão sem uso de medicação em comparação com os pacientes tratados (Nikkheslat et al., 2020). Além disso, cortisol elevado também foi correlacionado com escores de anedonia mais altos e pensamentos suicidas mais altos em pacientes com TDM (Ahmed et al., 2016). O tratamento antidepressivo com várias classes de medicamentos antidepressivos geralmente diminui ou normaliza os níveis de cortisol em pacientes com depressão (Nandam et al., 2020).

Estudos com roedores e humanos relatam que o estresse e os glicocorticóides influenciam diretamente a expressão de fatores que regulam negativamente a tradução das proteínas sinápticas (Duman et al., 2016). Provavelmente uma grande quantidade de genes esteja envolvida no funcionamento normal do eixo HPA, mas apenas alguns desses genes foram estudados no contexto de transtornos depressivo, sendo os genes com maior probabilidade de estarem envolvidos aqueles que codificam os alvos do cortisol e outros hormônios glicocorticóides secretados durante o estresse (Shadrina, et al., 2018).

2.2.4 Estresse oxidativo

As espécies reativas de oxigênio (ERO) têm papéis fundamentais na sinalização celular e na defesa contra microrganismos invasores (Bhatt et al., 2020). Em condições normais, a formação de ERO é um processo normalmente compensado pelo sistema de defesa antioxidante de um organismo, entretanto, esse equilíbrio pode ser quebrado tanto pelo aumento da produção de espécies reativas de oxigênio quanto pela diminuição do sistema de defesa (Dal-Pizzol et al., 2000). O estresse oxidativo consiste neste desequilíbrio entre a produção e eliminação de radicais livres que leva a uma geração anormal de ERO e danos oxidativos (Angeloni et al., 2017). ERO comumente descritas são o radical superóxido, peróxido de hidrogênio, radical hidroxila e oxigênio singlete. Outros oxidantes importantes, que atuam em conjunto com os ERO, são as espécies reativas de nitrogênio (ERN) como o óxido nítrico, o nitrato e o nitrito (Juszczyk et al., 2021; Pizzino et al., 2017).

Quando a produção de ERO supera as defesas antioxidantes, ocorrem efeitos destrutivos em proteínas celulares, ácidos nucleicos e lipídios, perturbando os mecanismos normais de sinalização celular e ocasionando doenças como o câncer ou doenças neurológicas (Correia et al., 2023).

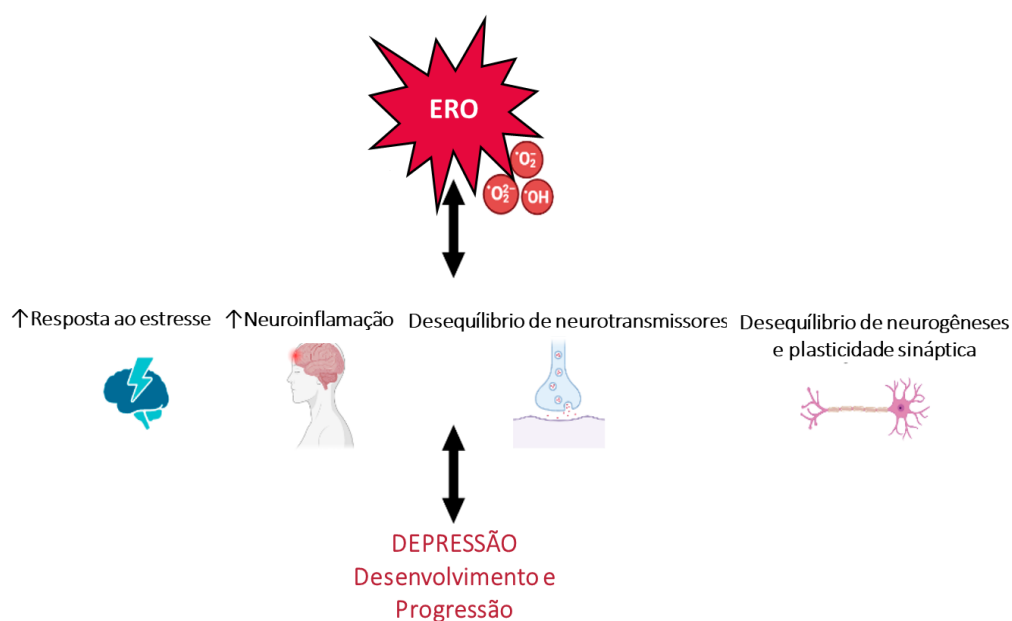
Os mecanismos de defesa antioxidante são importantes para neutralizar os efeitos nocivos do estresse oxidativo. Estes compreendem componentes fisiológicos podem ser enzimáticos ou não enzimáticos (Correia et al., 2023), e exercem sua ação fornecendo seus elétrons às ERO e, assim, são reduzidos (Bhatt et al., 2020). A catalase, superóxido dismutase, glutatona peroxidase e glutatona redutase são enzimas antioxidantes endógenas importantes, enquanto que, a glutatona reduzida é o antioxidante endógeno não enzimático de maior importância (Budni et al., 2013).

O cérebro é mais vulnerável ao estresse oxidativo. As células cerebrais, devido às suas altas necessidades energéticas, possuem alto consumo de oxigênio, tornando o cérebro mais

susceptível à formação de radicais livres. Elas também possuem alto conteúdo lipídico, sendo mais passíveis de sofrer peroxidação lipídica mediada por ERO, além de possuírem defesa antioxidante mais fraca (Angeloni et al., 2017; Bhatt et al., 2020; Shuster et al., 2022). As biomembranas atacadas pelo excesso de radicais propagam a reação em cadeia da peroxidação lipídica, o que ocasiona morte celular por apoptose e autofagia (Juszczyk et al., 2021).

O estresse oxidativo é uma das principais causas de neurodegeneração e seu envolvimento na patogênese do transtorno depressivo maior (TDM) é bem estabelecido (Bhatt et al., 2020). Está correlacionado com a patogênese e progressão da depressão. Níveis elevados de ERO estão associados, promovendo ou sendo promovidos, à resposta ao estresse, neuroinflamação, desequilíbrio de neurotransmissores e desequilíbrio de neurogênese/plasticidade sináptica que estão subjacentes à fisiopatologia da depressão, no desenvolvimento e progressão da doença (Figura 5) (Correia et al., 2023).

Figura 5 – Estresse oxidativo correlacionado a patogênese e progressão da depressão.



Fonte: Adaptado de Correia et al. (2023).

A maioria dos estressores tem a capacidade de ativar o eixo HPA. A hiperativação do eixo HPA leva a secreção maior de glicocorticoides como o cortisol. O aumento dos níveis de cortisol contribui para a produção de radicais livres, cujo excesso gera estresse oxidativo (Sotiropoulos et al., 2008; Juszczyk et al., 2021). O aumento da atividade das ERO implica um aumento na atividade de enzimas pró-oxidantes como a monoamina oxidase (MAO), que é envolvida no metabolismo da serotonina (Juszczyk et al., 2021). A oxidação de monoamina

produz ânions superóxido no cérebro (Bhatt et al., 2020). Por outro lado, o aumento da produção de ERO também contribui para induzir a hiperativação no eixo HPA (Correia et al., 2023).

Foi relatado que altos níveis de estresse oxidativo estão relacionados a interrupções nas vias relacionadas à serotonina, ao volume de algumas áreas do cérebro, como o hipocampo e o córtex pré-frontal, e o comprometimento da neurogênese e da plasticidade sináptica, principalmente conectando-os ao BDNF (Belleau et al., 2019; Correia et al., 2023).

A produção de ERO também leva à secreção de mediadores inflamatórios, que por sua vez podem levar a alterações neurodegenerativas no cérebro (Juszczak et al., 2021). Logo, neutralizar os efeitos nocivos dos altos níveis de estresse oxidativo consiste numa estratégia promissora para o tratamento da depressão (Correia et al., 2023).

2.3 Modelo não-clínico e seu uso no estudo na depressão

A utilização de animais tem uma grande importância para pesquisas científicas, possuindo contribuição no desenvolvimento das ciências biológicas e da saúde, descobrindo-se novos medicamentos e permitindo pesquisas básicas, desenvolvimento tecnológico, ensino, produção e testes de imunobiológicos (Machado & Zatti, 2015; Molinaro et al., 2009).

Essa vasta contribuição da experimentação animal nos diferentes campos científicos vem promovendo ao longo do tempo a descoberta de medidas profiláticas e tratamentos de inúmeras enfermidades que acometem os seres vivos (Chorilli et al., 2009). Sua utilização em laboratório permite várias abordagens experimentais que não são possíveis, ou mesmo permitidas por lei, em seres humanos (Molinaro, et al., 2009). Apesar de, atualmente, se preconizar a utilização de métodos alternativos, como os estudos *in vitro* e culturas de células, os modelos animais apresentam como principal vantagem o fornecimento de informações sobre o organismo como um todo, fato que não é conseguido com outros métodos, o que ainda possibilita o seu emprego em pesquisas científicas (Chorilli et al., 2009).

Porém, é necessário o estabelecimento de um conjunto de cuidados, consciência e responsabilidades dirigidas à melhoria da descoberta científica e ao bem-estar dos animais. Esses conhecimentos são de fundamental importância para a adequada utilização na experimentação (Molinaro et al., 2009). Devido a isso, uma procura frequente ocorre por novas técnicas que promovam o bem-estar do animal, sendo um aspecto relevante na otimização de experimentos (Machado & Zatti, 2015). No Brasil, a Lei Arouca, nº 11.794, lei para uso de animais em ex-

perimentação, foi sancionada em 2008 e regulamenta a criação e a utilização de animais em atividade de ensino e pesquisa científica em todo o território nacional.

Animais de várias espécies têm sido utilizados nos últimos tempos, sendo os camundongos os mais intensamente utilizados e os mais profundamente conhecidos cientificamente (Chorilli et al., 2007; Machado & Zatti, 2015). O camundongo de laboratório é um mamífero pertencente à família *Muridae*, subfamília *Murinae*, ordem *Rodentia*, gênero *Mus*, espécie *Mus musculus* (Lapchik et al., 2017). Sua introdução como animal de laboratório deve-se principalmente ao fato de ser pequeno, muito prolífero, ter período de gestação curto, ser de fácil domesticação e manutenção experimentação animal (Andrade et al., 2002).

Os modelos animais, principalmente com pequenos roedores, como camundongos, podem ser um instrumento eficiente para a determinação da etiologia neurológica dos transtornos mentais, acrescentando conhecimento aos mecanismos neurológicos da sua etiologia e possibilitando a aplicação de novas terapias (Silva et al., 2012). Em geral, eles devem atender a três valores básicos: a validade preditiva que se refere à responsividade específica e seletiva aos tratamentos; a validade de face que corresponde às semelhanças do fenótipo da doença entre o modelo animal e a condição humana; e a validade de construto que significa que o modelo tem uma fundamentação teórica sólida, como equivalência dos fatores causadores ou desencadeantes da doença (Planchez et al., 2019).

2.3.1 Modelo farmacológico com administração de glicocorticóides

Os pacientes com transtorno depressivo maior podem apresentar hipercortisolemia. Modelos atuais consistem na exposição de animais a altos níveis de glicocorticóides para imitar o estresse crônico (Planchez et al., 2019). É relatado que tanto a administração de dexametasona, como de corticosterona, produzem comportamentos semelhantes à depressão em modelos animais (Anacker et al., 2011; Dabbah-Assadi et al., 2022; Fraga et al., 2021; Mesripour & Rakhshankhah, 2021; Wu et al., 2021; Lopes et al., 2018; Pariante et al., 2001).

Em estudos com modelo de depressão induzida por doses repetidas de glicocorticóides, as fêmeas podem apresentar uma resposta mais sensível ao estresse e aos efeitos de antidepressivos em comparação aos machos, o que pode ser um reflexo da interação entre hormônios sexuais e o eixo HPA. Isso é importante para a pesquisa translacional, já que as mulheres são mais propensas a desenvolver depressão maior do que os homens (Kuehner, 2017).

A administração de dose única ou de longo prazo de dexametasona, um glicocorticóide, em roedores promoveu comportamentos do tipo depressivo em camundongos promovendo

um aumento do tempo de imobilidade no teste de nado forçado e teste de suspensão da cauda, anedonia deduzida pela diminuição da preferência pela sacarose (Lim et al., 2018; Mesripour & Rakhshankhah, 2021; Skupio et al., 2015; Wu et al., 2021), níveis séricos mais elevados de IL-1 β (Wu et al., 2021) e corticosterona (Lim et al., 2018; Wu et al., 2021), diminuição no BDNF hipocampal (Lim et al., 2018) e morfologia neuronal alterada (Conti et al., 2017), além de aumento dos níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e diminuição dos níveis de antioxidantes como a catalase (Falade et al., 2021; Patel et al., 2014).

A administração de corticosterona também aumentou o comportamento de imobilidade nos testes de natação forçada e suspensão de cauda, bem como diminuição da ingestão de sacarose no teste de preferência de sacarose, juntamente com a diminuição dos níveis de BDNF no hipocampo (Bai et al., 2018; Chaves et al., 2019; Lopes et al., 2018), aumento dos níveis séricos de corticosterona (Bai et al., 2018; Kv et al., 2018), diminuição dos níveis de 5-hidroxitriptamina (5-HT) e norepinefrina (NE) no hipocampo (Bai et al., 2018). Além disso, houve aumento de citocinas relacionadas como TNF- α , IFN- γ e IL-2 (Chaves et al., 2020), de marcadores pró-oxidantes (peroxidação lipídica e nitrito/nitrato) e diminuição de marcadores antioxidantes, como a glutatona em áreas do cérebro (Chaves et al., 2020; Kv et al., 2018; Lopes et al., 2018).

2.3.2 Estudo da toxicidade em modelo não-clínico

Os testes toxicológicos são fundamentais para se ter dados sobre as condições em que os agentes químicos produzem efeitos tóxicos, qual a natureza desses efeitos e quais os níveis seguros de exposição (Hayes & Loomis, 1996). Uma compreensão da farmacocinética da substância no organismo também contribui no estudo da sua efetividade e toxicidade (Horky et al., 2019). E independentemente dos resultados farmacológicos, o estudo toxicológico é essencial para a caracterização da substância e seu uso seguro em humanos.

Os testes de toxicidade em modelos não clínicos, como roedores e outros animais de laboratório, são essenciais para a avaliação da segurança de novas substâncias antes de seu uso em humanos e ajudam a identificar potenciais efeitos adversos e determinar perfis de segurança (Parasuraman, 2011).

No Brasil, o Guia para a condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessária ao desenvolvimento de medicamentos da Agência Nacional de Vigilância Sanitária oferece orientação para a condução de estudos não clínicos de segurança durante o desenvolvimento de medicamentos. Também é orientado o uso de guias da *Organization for Economic Cooperation and Development* (OECD) (ANVISA, 2013). Entre os princi-

países tipos de toxicidade avaliados, destacam-se a toxicidade aguda e a toxicidade de doses repetidas.

A toxicidade aguda refere-se aos efeitos adversos que ocorrem após a administração de uma dose única de uma substância, ou dose pode ser administrada em frações menores ao longo de um período não superior a 24h, seguido de observação dos animais por 14 dias após a administração. Este tipo de teste é crucial para determinar a dose letal média (DL_{50}), que representa a quantidade de substância que causa a morte em 50% da população testada. Além da DL_{50} , a avaliação de sintomas clínicos, alterações comportamentais e lesões em órgãos são monitoradas para uma compreensão abrangente dos efeitos imediatos. Dessa forma, consiste em uma avaliação preliminar que ajuda a identificar efeitos imediatos e a estabelecer critérios de segurança para o manejo e o uso da substância, resultantes de uma exposição de curta duração, sendo obrigatórios para toda substância em teste (OECD, 2001).

A toxicidade de doses repetidas é avaliada quando a substância é administrada em múltiplas doses ao longo de um período prolongado e têm como objetivo caracterizar o seu perfil toxicológico pela administração repetida. Essa avaliação é vital para entender os efeitos cumulativos que podem surgir da exposição contínua. Os testes podem focar em identificar alterações em parâmetros fisiológicos, hematológicos, bioquímicos, anátomo e histopatológicos (OECD, 2008).

Devido à complexidade inerente dos sistemas biológicos, também é útil o emprego de métodos alternativos, visando contribuir com uma informação diferente que pode ser usada para alcançar uma compreensão mais completa de como um produto químico interage com um sistema biológico (Madden et al, 2020). A toxicologia *in silico* é um campo emergente e tem como objetivo prever certos perigos, como mutagenicidade ou toxicidades orgânicas, com base em modelos computacionais, podendo desempenhar um papel importante no fornecimento de informações complementares aos testes de toxicidade *in vitro* e *in vivo* (Hemmerich & Ecker, 2020). Uma ampla gama de ferramentas *in silico* estão disponíveis que podem prever as características ADME (absorção, distribuição, metabolismo e excreção) de um produto químico, bem como sua atividade intrínseca de toxicidade (Madden et al, 2020). Também é um meio de identificar perigos de compostos antes da síntese, em estágios que são muito iniciais do desenvolvimento dos medicamentos. Isso pode direcionar a escolha dos compostos principais, não apenas em relação à eficácia, mas também à segurança (Hemmerich & Ecker, 2020).

2.4 Tratamento farmacológico da depressão

O Transtorno Depressivo Maior é um problema significativo de saúde pública. O tratamento ineficaz e prolongado traz sofrimento do paciente e produz consequências econômicas na área da saúde. Os ensaios longos e malsucedidos com antidepressivos podem diminuir as expectativas dos pacientes, reforçar cognições negativas e predispor os pacientes a experimentarem uma eficácia diminuída da medicação em ensaios futuros, contribuindo para maior resistência ao tratamento (Leuchter et al., 2009). O reconhecimento e o tratamento precoces são cruciais, já que a duração da depressão não tratada se correlaciona com piores resultados e as comorbidades podem prolongar o curso da doença (Kraus et al., 2019). Também é relatado que adolescentes e idosos possuem maiores taxas de recaída e/ou abandono do tratamento, necessitando de uma maior atenção nestas faixas etárias (Kato et al., 2021).

A capacidade de diagnosticar e tratar com sucesso a depressão possui limitações significativas. O tratamento da depressão envolve formas de psicoterapia e a farmacoterapia com antidepressivos. Nos casos graves ou na depressão resistente ao tratamento, a eletroconvulsoterapia também é aplicada (Kraus et al., 2019; Schloss & Henn, 2004).

Os antidepressivos compreendem uma variedade de compostos químicos com mecanismos farmacológicos distintos, o que define não apenas as ações terapêuticas, mas também os efeitos colaterais da ampla gama de antidepressivos disponíveis (Stahl, 1998).

Os dois mecanismos clássicos são os dos antidepressivos tricíclicos (ADTs) e dos inibidores da monoamina oxidase (IMAOs) e se tornaram disponíveis para terapia em perto da década de 1960. Os IMAOs são inibidores das principais enzimas metabólicas dos neurotransmissores monoaminas norepinefrina (NE), serotonina (5-HT) e dopamina (DA), aumentando a disponibilidade de monoaminas em todo o sistema nervoso central (SNC). Os clássicos, como a tranilcipromina, são não seletivos e irreversíveis à MAO-A e MAO-B, mas outros IMAOs podem ser mais seletivos ou reversíveis. Porém, os IMAOs têm seu efeito limitado devido a interações com alimentos e medicamentos e serem associados a potencial de hipertensão (Riederer et al., 2004; Stahl, 1998).

Enquanto que, os ADTs, introduzidos logo após os IMAOs, são uma classe com estrutura química derivada das fenotiazinas, incluindo medicamentos como imipramina e amitriptilina. Seu principal mecanismo é a inibição dos transportadores de membrana para as monoaminas NE e 5-HT, com grau de seletividade da inibição dos transportadores NE *versus* 5-HT diferentes entre si, o qual resulta em aumento da disponibilidade extracelular de neurotransmissores monoaminas. Embora, os ADTs sejam agentes não seletivos eficazes, são caracteri-

zados por possuir efeitos adversos, principalmente devido ao antagonismo variável dos receptores muscarínicos, adrenérgicos e histaminérgicos (Artigas et al., 2002; Racagni & Popoli, 2008; Stahl, 1998). A fraca tolerabilidade e efeitos adversos destes antidepressivos clássicos levaram à procura de agentes mais seletivos (Artigas et al., 2002). No momento, os ADTs são usados principalmente na depressão que não responde aos antidepressivos de uso mais comum (Fonseca et al., 2023).

Diferentes classes de medicamentos foram desenvolvidas entre as décadas de 1980 e 1990. A classe dos inibidores seletivos da recaptação de serotonina (ISRS), constituída por fluoxetina, sertralina, paroxetina, citalopram e escitalopram, é a mais amplamente utilizada por possuir um perfil mais favorável de efeitos adversos, com segurança e tolerabilidade melhorada (Racagni & Popoli, 2008; Santarsieri & Schwartz, 2015), sendo também relatada como mais eficaz na prevenção de recaídas (Kato et al., 2021; Stahl, 1998). Os ISRS inibem a recaptação da serotonina encontrada na maioria da classe de ADT, mas são seletivos apenas para este mecanismo (Santarsieri & Schwartz, 2015). Outras classes desenvolvidas foram os inibidores de recaptação de serotonina e norepinefrina (IRSN), inibidores seletivos da recaptação de norepinefrina (ISRN), antidepressivos noradrenérgicos e serotoninérgicos específicos e antagonistas 5-HT₂/inibidores da recaptação de serotonina (nefazodona) (Racagni & Popoli, 2008; Stahl, 1998). Atualmente, medicamentos como venlafaxina e duloxetina (IRSN), mirtazapina (antidepressivos noradrenérgicos e serotoninérgicos específicos com propriedades inibidoras de receptores α_2 -adrenérgicos e 5-HT₂) e reboxetina (ISRN) também são considerados escolhas primárias para o tratamento da depressão. Embora essas classes de medicamentos terem menos efeitos adversos que os ADTs, não oferecem uma melhoria da eficácia em relação a eles (Racagni & Popoli, 2008).

Todas estas classes vistas são baseadas em mecanismos monoaminérgicos, baseados na hipótese da monoamina em que os antidepressivos exercem sua ação elevando a concentração de monoaminas na fenda sináptica. Porém, a ação dos antidepressivos na sinalização das monoaminas é apenas o ponto de início para uma sequência complexa de alterações moleculares e celulares neuroadaptativas que provocam o efeito terapêutico (Sharp, 2013). Eles também têm uma resposta lenta e não são eficazes para todos os pacientes (Duman et al., 2021), sendo importante conhecer os mecanismos subjacentes à resistência aos antidepressivos, os quais permanecem indefinidos para que terapias mais eficazes sejam identificadas e desenvolvidas (Wigmore et al., 2020).

Diante disso, é necessário identificar novas classes de antidepressivos com repostas mais eficazes, menos efeitos colaterais e um início de ação mais rápido. A descoberta de me-

dicamentos que produza ação terapêutica por um mecanismo diferente dos monoaminérgicos disponíveis representam um dos maiores avanços para o tratamento da depressão nos últimos anos sessenta anos (Duman et al., 2021). A descoberta do rápido efeito antidepressivo da cetamina, antagonistas do receptor N-metil-D-aspartato (NMDA), direcionou os esforços para estudos de novos antidepressivos direcionados ao sistema glutamatérgico (Gerhard & Duman, 2018; Wang et al., 2022; Witkin et al., 2019). Recentemente, a escetamina intranasal foi aprovada para uso na depressão resistente (Kawczak et al., 2024).

Também medicamentos não glutamatérgicos, como a escopolamina que é um antagonista do receptor muscarínico da acetilcolina, estão sob investigação por seus rápidos efeitos antidepressivos (Gerhard & Duman, 2018; Wang et al., 2022; Witkin et al., 2019). Além disso, pesquisas têm se voltado para o estudo de constituintes de plantas medicinais no desenvolvimento de novos medicamentos (Badr et al., 2020; Girish et al., 2012; Dalmagro et al., 2022; Shakya, 2016).

2.5 Plantas medicinais e óleos essenciais

Há muito tempo, as plantas têm sido usadas popularmente e constituem uma boa fonte de matéria-prima na investigação de novas estratégias de tratamento e compostos com papéis promissores no tratamento de várias doenças (Fajemiroye et al., 2016; Martins & Sukumaran 2018; Nisar et al., 2021). Em torno de 25% dos fármacos prescritos no mundo são provenientes de plantas. A necessidade do mercado farmacêutico e o reconhecimento que a pesquisa com as plantas medicinais usadas na medicina popular é uma estratégia para o desenvolvimento de novos medicamentos ocasionaram um aumento da quantidade de publicações neste campo e ao apoio de instituições privadas e governamentais nas pesquisas (Rates, 2001).

As plantas medicinais constituem ferramentas promissoras para o tratamento da depressão (Ismail et al., 2018) e outros transtornos psiquiátricos (Martins & Sukumaran 2018). Várias plantas foram citadas por suas propriedades antidepressivas como *Hypericum perforatum*, *Pimenta pseudocaryophyllus*, *Rosmarinus officinalis*, *Curcuma longa*, *Zingiber officinale*, *Ocimum sanctum*, *Valeriana officinalis*, entre outras (Ismail et al., 2018). A funcionalidade dessas plantas é proposta devido à presença de uma infinidade de componentes bioativos (Khalil et al., 2017), que são metabólitos secundários que têm um potencial importante para atividades biológicas multifacetadas (Dereli et al., 2019).

Os fitoquímicos, compostos isolados de ervas medicinais, têm papéis farmacológicos no tratamento de várias doenças e constantemente são explorados por meio de vários estudos

experimentais para determinar a base molecular de como as plantas medicinais funcionam e para o surgimento de novas drogas (Martins & Sukumaran 2018). Diferentes categorias, incluindo fenilpropanóides e polifenóis (flavonóides, ácidos fenólicos, lignanos, cumarinas), alcalóides, terpenos e terpenóides, saponinas e sapogeninas, aminas, e carboidratos foram encontrados para possuir atividade antidepressiva. Naringenina, derivados de quercetina, eugenol, piperina, alcalóides diterpênicos, berberina, hiperforina, derivados de riparina, ginsenosídeos, bem como alcalóides β -carbolínicos estão entre os mais relevantes (Bahramsoltani et al., 2015).

Os óleos essenciais (OEs), derivados de diferentes partes de plantas aromáticas, têm sido bastante pesquisados por seus benefícios para a saúde (Ataei et al., 2020). Eles são misturas de metabólitos orgânicos voláteis de plantas que normalmente são líquidos oleosos em temperatura ambiente (Aponso et al., 2020). É relatado que os óleos essenciais podem regular a saúde do cérebro e as funções associadas ao humor e à neurodegeneração, o que reflete sua biodisponibilidade para o cérebro (Aponso et al., 2020). E são formados por uma mistura de várias moléculas orgânicas, como hidrocarbonetos, álcoois, ésteres, aldeídos, cetonas, fenóis, entre outros. Mas a maior parte dos óleos essenciais é composta de terpenos e fenilpropanóides (Bakkali et al., 2008). Em alguns fenilpropanóides estudados já foram encontrados atividade antidepressiva, como o eugenol e seus análogos *o*-eugenol, metil-eugenol e *bis*-eugenol, além de *trans*-anetol, ácido caféico, ácido elágico, entre outros (Araújo, 2018; Dalmagro et al., 2022; Do Amaral et al., 2013; Girish et al., 2012; Irie et al., 2004; Hassanzadeh et al., 2022; Norte et al., 2005).

2.5.1 *o*-Eugenol

O grupo de compostos orgânicos, os fenilpropanóides, forma uma grande classe de compostos fenólicos (Choudhury et al., 2019). A via fenilpropanóide serve como uma fonte rica de metabólitos em plantas, que é necessária para a biossíntese de lignina e que também contribui para a produção de muitos outros compostos importantes, como flavonóides, cumarinas e lignanas (Fraser & Chapple, 2011).

O eugenol, um fenilpropanóide, é um óleo amarelo pálido com aroma picante e peso molecular de 164,2 g/mol, um ácido fraco que é solúvel em solventes orgânicos (Nejad et al., 2017), frequentemente encontrado em óleos essenciais em uma ampla gama de espécies de plantas, incluindo *Eugenia caryophyllata* (cravo da Índia), *Cinnamomum verum* (canela), *Zingiber officinale* (gengibre), *Curcuma longa* (açafrão) e *Pimenta dioica* (pimenta). As princi-

países fontes naturais de eugenol correspondem a *Eugenia caryophyllata* (syn *Syzygium aromaticum*) e a *Cinnamomum verum* (Khalil et al., 2017; Nisar et al., 2021).

Atualmente, o eugenol também pode ser sintetizado por alilação de guaiacol com cloreto de alila obtendo propriedade funcional semelhante. É considerado não mutagênico e declarado como GRAS (geralmente reconhecido como seguro) pela Organização Mundial da Saúde (OMS) (Khalil et al., 2017). Estruturalmente, o eugenol é uma molécula simples, mas é amplamente utilizado para diversos fins em várias indústrias, como farmacêutica, alimentícia e cosmética, odontológica, agricultura e outras (Nejad et al., 2017; Nisar et al., 2021). Ele está sendo focado recentemente devido ao seu grande potencial na prevenção de várias condições crônicas (Nisar et al., 2021).

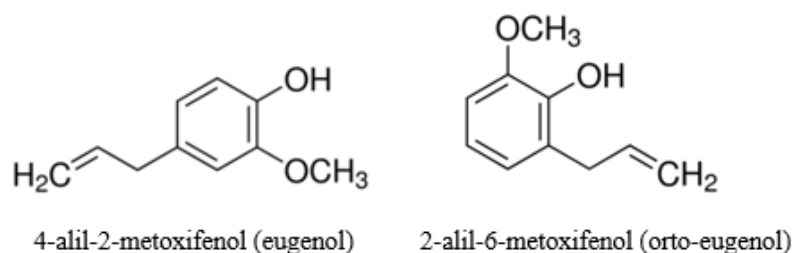
É reconhecido que o eugenol possui certas propriedades farmacológicas como antibacteriano (Ashrafudoulla et al., 2020), anti-inflamatório (Magalhães et al., 2019), antiviral (Lane et al., 2019), antifúngico (Zhao et al., 2021), anticarcinogênico (Fathy et al., 2019), efeitos pró-oxidantes e antioxidante (Bezerra et al., 2017). Foi documentada a atividade anticonvulsivante de constituintes comuns dos óleos essenciais, como eugenol, metileugenol, isoeugenol, em modelos experimentais (De Almeida et al., 2011; Joushi & Salmani, 2017). A ação anestésica do metileugenol e outros derivados do eugenol encontrados na fração de óleo volátil de *Myristica pagans* foi demonstrada em camundongos (Sell & Carlini, 1976). Eugenol e análogos, como o metileugenol e bis-eugenol, exibem atividade antidepressiva, reduzindo a imobilidade no um teste de natação forçada e um teste de suspensão de cauda, em camundongos (Do Amaral et al., 2013; Irie et al., 2004; Oliveira et al., 2023). O eugenol induziu a expressão de metalotioneína-III, uma proteína rica em cisteína que parece ter um papel de suporte no dano oxidativo por quelação de metais pesados e está envolvida no crescimento de neurônios, no hipocampo. Também, como outros antidepressivos, possui a capacidade de induzir o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) no hipocampo, que é necessário para que um antidepressivo exiba sua atividade (Irie et al., 2004) e foi sugerido que o aumento da complexidade dendrítica em neurônios hipocámpais após tratamento com eugenol pode ser associado à sinalização do BDNF (Akbar et al., 2021). Além disso, o eugenol inibe a monoamina oxidase A (MAO-A) e pode restaurar as monoaminas que estão diminuídas no cérebro de pacientes com depressão (Do Amaral et al., 2013; Tao et al., 2005).

Algumas pequenas alterações na estrutura molecular do eugenol podem levar a diferentes propriedades moleculares que ocasionam diferenças nas atividades biológicas (Nejad et al., 2017). Um exemplo foi que o levantamento de compostos estruturalmente relacionados ao eugenol identificou que alguns inibem monoamina oxidases (MAOs) de forma mais poten-

te. A relação de atividade das estruturas revelou características estruturais importantes para a inibição da monoamina oxidase A (MAO-A) e a monoamina oxidase B (MAO-B) (Tao et al., 2005).

O 2-alil-6-metoxifenol ou *o*-eugenol (orto-eugenol) é um isômero sintético do eugenol, que contém em sua estrutura um anel benzênico (Figura 6). O *o*-eugenol apresentou efeito antinociceptivo através de sua ação via sistema adrenérgico, e anti-inflamatório através da regulação de citocinas pró-inflamatórias e fosforilação de NF- κ B e p38 em camundongos (Fonsêca et al., 2016). Já se tem considerado na literatura que citocinas pró-inflamatórias estão associadas ao quadro de transtorno depressivo maior (Erjavec et al., 2020; Komori, 2017). Em outro estudo, foi encontrado efeito ansiolítico e antioxidante do *o*-eugenol (Godoy et al., 2023).

Figura 6 – Estrutura do eugenol e *o*-eugenol.



Fonte: Sigma-Aldrich (2021).

Além desses dados, o trabalho de Araújo (2018) mostrou que camundongos fêmeas Swiss submetidas ao protocolo de administração aguda de dexametasona a 64 μ g/kg e tratadas com *o*-eugenol obtinha reversão do comportamento do tipo depressivo, por influência nas vias dopaminérgica e adrenérgica. Então, tornou-se necessária a continuidade dos estudos em relação ao *o*-eugenol e sua atividade antidepressiva, utilizando a indução do comportamento depressivo com doses repetidas de dexametasona que irá avançar no estudo do efeito antidepressivo do *o*-eugenol por a depressão se tratar de uma doença crônica e promover alterações neuroquímicas influenciadas pela duração da doença, além da pesquisa de outros mecanismos de ação que promovem seu efeito antidepressivo e caracterização do perfil toxicológico agudo e subagudo com a administração oral do *o*-eugenol para seu uso seguro.

4 OBJETIVOS

4.1 Geral

Investigar a toxicidade e a atividade antidepressiva-símile do *o*-eugenol em camundongos por meio de administrações repetidas de dexametasona.

4.2 Específicos

- a) Investigar os parâmetros farmacocinéticos e toxicidade *in silico* do *o*-eugenol;
- b) Analisar a toxicidade aguda por via oral do *o*-eugenol por meio de parâmetros fisiológicos, comportamentais e anatomopatológicos em camundongos, e junto estimar a DL₅₀ do *o*-eugenol;
- c) Avaliar a toxicidade de doses repetidas do *o*-eugenol por meio de parâmetros bioquímicos, hematológicos, fisiológicos, comportamentais e anatomopatológicos em camundongos;
- d) Examinar a atividade antidepressiva do *o*-eugenol no modelo de depressão animal por administração de doses repetidas de dexametasona no teste comportamental de nado forçado, suspensão pela cauda e preferência por sacarose;
- e) Estudar o efeito do *o*-eugenol na coordenação motora de camundongos no *rotarod*;
- f) Verificar o sinergismo do *o*-eugenol com antidepressivo imipramina;
- g) Analisar o efeito do *o*-eugenol no limiar de convulsões através do modelo de convulsões induzidas por pentilenotetrazol (PTZ);
- h) Investigar os níveis séricos de interleucina1- β (IL-1 β), além de parâmetros do estresse oxidativo e estudo metabólico em estruturas cerebrais.

5 MÉTODOS

5.1 Local da pesquisa

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Psicofarmacologia, mas também contou com a contribuição do Laboratório de Ensaio Toxicológicos Não-clínicos e Clínicos (LABETOX) nos testes bioquímicos e hematológicos, do Setor de Histopatologia do Laboratório Multiusuário do DMORF (Departamento de Morfologia) na análise histopatológica e do Laboratório Multiusuário de Caracterização e Análise (LMCA) no estudo metabólico. Todos os setores estão localizados na Universidade Federal da Paraíba (UFPB).

5.2 Animais, condições experimentais e aspectos éticos

Foram utilizados camundongos albinos, espécie *Mus musculus*, linhagem Swiss, fêmeas, pesando entre 25-35 g, com aproximadamente 2 meses de idade, provenientes da Unidade de Produção Animal (UPA) do Instituto de Pesquisas em Fármacos e Medicamentos (IPeFarM) da UFPB.

Os animais foram previamente pesados e alojados em gaiolas de polietileno (30 x 20 x 13 cm), contendo 3 ou 4 animais cada, com no mínimo 2h de antecedência à execução dos testes, visando minimizar as possíveis alterações comportamentais do animal e permitir uma adaptação à sala onde ocorreu o experimento. Tiveram livre acesso a ração tipo *pellets* (Quimtia®) e água disponíveis em garrafas de polietileno, submetidos a um ciclo de claro-escuro 12:12, sendo a fase clara de 6h às 18h e mantidos a temperatura $21 \pm 1^\circ\text{C}$. Todos os procedimentos experimentais foram realizados entre 6h e 12h.

Os animais foram distribuídos aleatoriamente nas gaiolas que constituíram os grupos com números iguais de camundongos de cada experimento. Foi atribuído um número aleatório a cada gaiola e os animais receberam uma designação de grupo e foram pesados. Eles foram manipulados evitando estresse desnecessário, adotando procedimentos como o respeito aos tempos limites de exposição do animal aos estímulos dos testes descrito nas metodologias citadas, minimizando o número de animais, realizando manutenção e manejo adequados e proporcionando conforto físico e estado adequado de nutrição. Com o objetivo de ter um número de animais utilizados e ainda ter uma boa estimativa de efeito, utilizou o número de animais (n) de 8 por grupo, com exceção dos testes de avaliação de toxicidade da substância que conterà com menos animais (3 ou 6).

Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPB, protocolada sob CEUA nº 5029280422 (Anexo A), e seguiram rigorosamente as normas brasileiras da Lei nº 11.794 de 08 de outubro de 2008 (Lei Arouca), que dispõe sobre procedimentos para o uso científico de animais, com a preocupação em conduzir a pesquisa sem causar dor e sofrimento aos animais, seguindo os princípios éticos da experimentação animal. Quando necessário, os animais foram eutanasiados e descartados de acordo com critérios estabelecidos na Resolução Normativa nº 37, seção I, de 15 de fevereiro de 2018, que trata da Diretriz da Prática de Eutanásia do CONCEA (Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal). Durante os experimentos, os animais foram removidos do estudo por morte natural ou sacrificados por razões de bem-estar animal, conforme diretrizes determinadas pelo CONCEA.

5.3 Drogas e preparação

As substâncias, junto com doses e procedência, foram:

- a) *o*-eugenol (orto-eugenol) (25, 50 e 100, 300 e 2000 mg/kg) - Sigma Aldrich (EUA);
- b) Solução de Tween 80 (Polissorbato 80) a 0,5% e 1% – Vetec (Brasil);
- c) Solução salina (NaCl a 0,9%) – AFV Farma (Brasil);
- d) Dexametasona (32 e 64 µg/kg) - Aché (Brasil);
- e) Imipramina (5, 15 e 30 mg/kg) - Cristália (Brasil);
- f) Pentilenotetrazol (35 e 70 mg/kg) - Sigma Aldrich (EUA).

O *o*-eugenol foi emulsificado em Tween 80 (Polissorbato 80) a 1% em solução salina a 0,9% e a imipramina foi em Tween 80 a 0,5% em solução salina a 0,9%. As doses de *o*-eugenol foram estabelecidas após a estimativa da DL₅₀ com uso de via oral (v.o.) e da observação dos testes feitos por Fonsêca e colaboradores (2016) e Araújo (2018). Para o controle negativo, foi utilizado solução salina a 0,9% ou a solução de Tween 80 a 1% v.o.

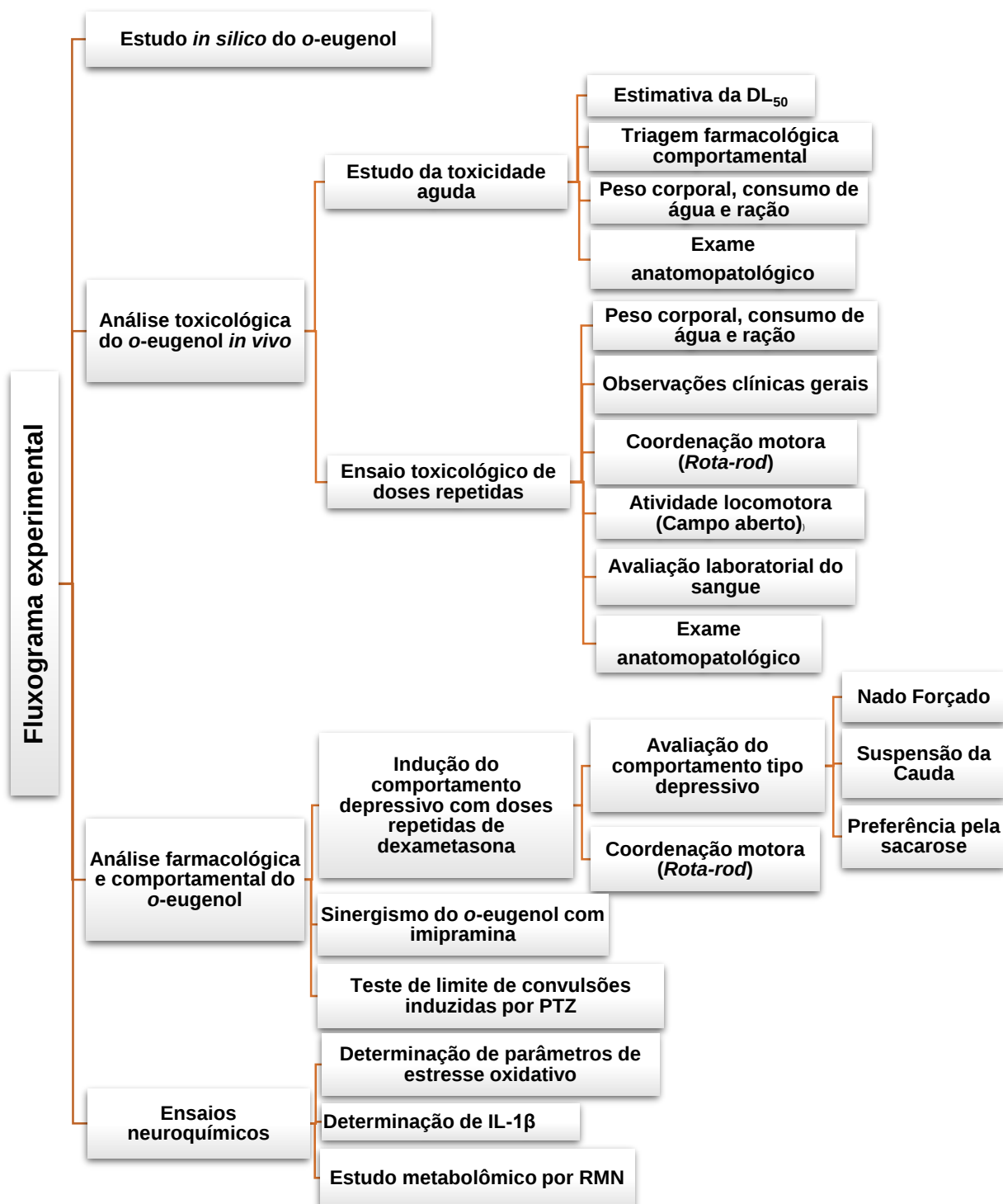
Foi feita administração por via oral (v.o) para *o*-eugenol e a imipramina. Antes dos testes, os animais foram privados de água e ração por 2h para evitar interação com a substância administrada por via oral. A dexametasona teve administração por via subcutânea (s.c.), enquanto pentilenotetrazol foi por via intraperitoneal (i.p.). Todas as drogas foram administradas em um volume de 0,1 ml/10 g de peso do animal.

Além dessas substâncias, também foram utilizadas outras contidas em kits comerciais já padronizadas para os testes bioquímicos, hematológicos e neuroquímicos.

5.4 Fluxograma experimental

Os experimentos seguiram o esquema abaixo (Figura 7).

Figura 7 - Fluxograma experimental.



5.5 Estudo da toxicidade *in silico*

Foram utilizadas plataformas virtuais como pkCSM e SwissADME, que utilizam modelos preditivos *in silico*, cujos modelos matemáticos contribuem na identificação precoce de problemas na absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade (ADMET). Inicialmente, foi avaliado a conformidade do *o*-eugenol frente aos parâmetros de Lipinski, que pode ser interpretado como um indicador de suas potenciais propriedades farmacêuticas. Após isso, foram estabelecidos parâmetros de absorção, utilizando modelos computacionais para avaliar a permeabilidade em células Caco-2, absorção gastrointestinal e permeabilidade dérmica, juntamente com o modelo de previsão baseado no ovo cozido, ou "*boiled-eggs*". Com relação ao parâmetro de distribuição, foram obtidos valores da sua distribuição teórica que se correlaciona com a capacidade em que a molécula tem de se distribuir pelo tecido do corpo após a administração, a permeabilidade na barreira hematoencefálica e consequentemente sua chegada ao sistema nervoso central. A utilização da ferramenta virtual também permitiu a avaliação do potencial da estrutura como substrato ou inibidor do sistema enzimático de metabolização mitocondrial, conhecido como CYP450. Além disso, foi utilizada na avaliação antecipada de potenciais respostas tóxicas de substâncias químicas pelos testes de toxicidade, como os testes de Ames, para prever a mutagenicidade de compostos.

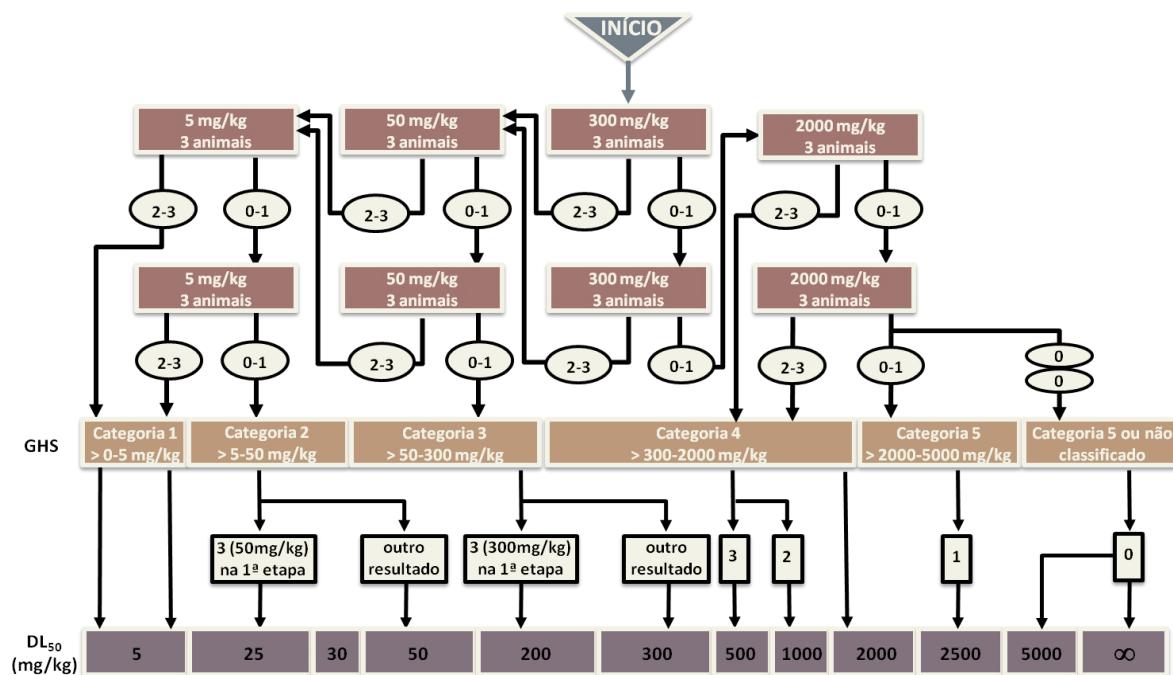
5.6 Estudo da toxicidade aguda do *o*-eugenol

A toxicidade oral aguda refere-se aos efeitos adversos que ocorrem após a administração oral de uma dose única de uma substância, ou doses múltiplas administradas em 24h. A estimativa da DL_{50} foi realizada de acordo com a metodologia preconizada pela *Organization for Economic Cooperation and Development* (OECD) em suas diretrizes para o Teste de Produtos Químicos com o teste nº 423 sobre toxicidade aguda (OECD, 2001).

Os animais, selecionados aleatoriamente e marcados para permitir a identificação individual, foram mantidos em suas gaiolas por pelo menos 5 dias antes da administração das doses para permitir a aclimação às condições do laboratório. A substância foi administrada por via oral a um grupo de animais experimentais em uma das doses definidas pela OECD (300 mg/kg), por via oral (gavagem), sendo testada por meio de um procedimento gradual, cada etapa usando 3 animais do sexo feminino, onde ausência ou presença de mortalidade de uma etapa determinou a próxima etapa e houve o direcionamento para a utilização também da dose de 2000 mg/kg (Figura 8). O grupo controle recebeu uma solução Tween 80 a 1% em

solução salina. O valor DL_{50} é expresso em termos de peso da substância de teste por unidade de peso do animal de teste (mg/kg).

Figura 8 – Procedimento para o ensaio de toxicidade aguda em dose única com dose inicial de 300 mg/kg de peso corporal.



Fonte: Adaptado de OECD (2001).

Nota: 0,1,2,3: número de moribundos ou animais mortos em cada etapa. GHS: Sistema de Classificação Mundial Harmonizado (mg/kg de peso corporal). ∞ : não classificado.

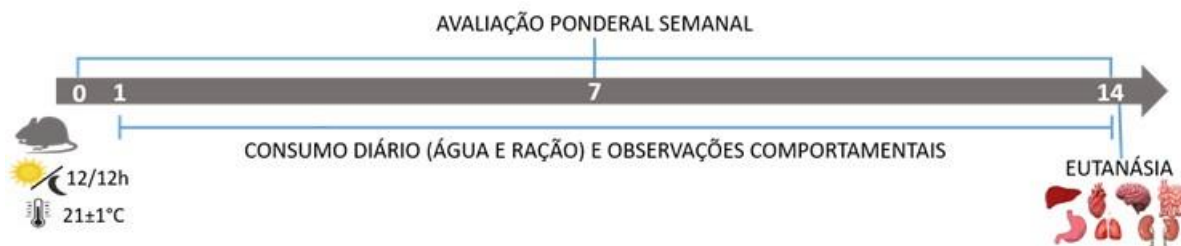
Os animais foram observados individualmente após a administração de pelo menos uma vez durante os primeiros 30 min., periodicamente durante as primeiras 24h, com atenção especial nas primeiras 4h, e diariamente depois disso, por um total de 14 dias, exceto quando removidos do estudo por morte natural ou sacrificados por razões de bem-estar animal, conforme diretrizes determinadas pelo CONCEA. Foram feitas observações como mudanças na pele e pêlos, olhos e membranas mucosas, nos sistemas respiratórios e circulatórios, além de atividade somatomotora e padrão de comportamento, com atenção para tremores, convulsões, salivação, diarreia, letargia, sono e coma (OECD, 2001).

Os pesos individuais dos animais foram determinados semanalmente. Também foi avaliado o consumo de água e de ração na forma de *pellets* pelos animais diariamente os 14 dias de observação. Ao fim do período de observação, todos os animais sobreviventes foram sacrificados por injeção de cetamina (210 mg/kg) e a xilazina (30 mg/kg), via i.p., segundo recomendação do CONCEA, minimizando dor e desconforto do animal. Após a eutanásia, foi

feito a avaliação macroscópica dos órgãos e colhidas amostras de fígado, pulmão, coração, rim, intestino delgado, estômago e encéfalo dos animais para estudos histopatológicos de órgãos.

O desenho do estudo da toxicidade aguda está representado na Figura 9.

Figura 9 – Desenho do estudo de toxicidade aguda.



5.6.1 Triagem farmacológica comportamental

A triagem farmacológica comportamental é um teste preliminar para caracterização do efeito de fármacos no sistema nervoso central (SNC) e sistema nervoso autônomo (SNA). Neste teste, são considerados alguns parâmetros comportamentais no animal que permitem assinalar o efeito central do fármaco, como hiperatividade, sedação, analgesia, tremores, diarreia (Almeida et al, 1999; Almeida & Oliveira, 2006). Os parâmetros comportamentais foram analisados, até os primeiros 30 min. da administração e com 1h, 2h, 3h e 4h, e os efeitos foram então verificados seguindo o protocolo experimental padrão (Almeida & Oliveira, 2006) (Anexo B).

A triagem farmacológica foi feita com os mesmos animais e doses utilizadas para obter a estimativa da DL_{50} . A observação do comportamento é útil para a determinação de testes específicos a serem utilizados para a avaliação dos efeitos da substância testada.

5.6.2 Consumo de água, alimento e avaliação ponderal

Foi avaliado o consumo de água e de ração na forma de *pellets* pelos animais durante os 14 dias de observação. Mamadeiras graduadas cheias foram colocadas e, no dia seguinte, foi registrado o volume de água ingerido pelos animais. Em relação ao consumo de alimentos, a ração foi colocada diariamente e, no dia posterior, foi contabilizado o peso consumido de ração. A pesagem individual dos animais foi feita pouco antes da substância de ensaio ser administrada e, posteriormente, semanalmente.

5.6.3 Exame anatomopatológico

Os órgãos foram analisados macroscopicamente e as ressecções foram executadas do fígado, pulmão, coração, rim, intestino delgado, estômago e encéfalo (cortados por incisão sagital). Os órgãos seccionados foram imersos em solução fixadora de formaldeído a 10% e após 72 h da fixação, foram preparados para processamento histopatológico: desidratação em série crescente de álcool (70% a 100%), diafanização em xilol e impregnação com inclusão em parafina. Os órgãos foram seccionados com espessura de 5 μ m, montados em lâminas, corados com hematoxilina e eosina e posteriormente examinados em microscópio óptico de 100 e 400x. (Cardiff et al., 2014). Dentre os principais parâmetros investigados, estão lesões celulares reversíveis (degenerações) e irreversíveis (necrose), congestão e extravasamento de sangue.

5.7 Ensaio toxicológico oral não-clínico de doses repetidas

O ensaio de toxicidade oral de doses repetidas foi direcionado pelo Guia para a condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessária ao desenvolvimento de medicamentos da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2013) e do teste 407 da *Organization for Economic Cooperation and Development* (OECD, 2008) com modificações. Os animais pré-selecionados foram distribuídos em um dos grupos de seis animais fêmeas cada. Os grupos (n= 6) foram tratados diariamente, no turno da manhã, por via oral (gavagem) por um período de 28 dias. No grupo controle foi administrado o veículo (salina) e o outro grupo foi tratado com a maior dose com maior efeito nos testes comportamentais (100 mg/kg).

Observações clínicas gerais foram feitas pelo menos uma vez ao dia. Foram observados sinais como alterações na pele, pelagem, olhos, mucosas, ocorrência de secreções e excreções, e atividade autonômica (por exemplo, lacrimejamento, piloereção, tamanho da pupila, padrão respiratório incomum). Alterações na marcha, postura e resposta ao manuseio, bem como a presença de movimentos clônicos ou tônicos, estereotípias ou comportamento bizarro (por exemplo, automutilação, andar para trás) também foram registradas (OECD, 2008).

Avaliações da administração prolongada da substância foram feitas sobre o consumo de água e alimentos, evolução ponderal, testes comportamentais realizados e avaliação laboratorial do sangue dos animais. A eutanásia dos animais foi realizada após os 28 dias, por sobredose de solução anestésica, contendo cetamina (300 mg/kg) e xilazina (30 mg/kg), via i.p.,

segundo recomendação do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). Também foram realizados exames histopatológicos de órgãos dos animais em estudo. Os resultados foram comparados com os dados obtidos nos animais do grupo controle e com dados da literatura.

O desenho do estudo da toxicidade subaguda está representado na Figura 10.

Figura 10 – Desenho do estudo de toxicidade subaguda.



5.7.1 Consumo de água, ração e avaliação ponderal

A pesagem dos animais, o consumo de água e ração na forma de *pellets* pelos animais foram observados semanalmente.

5.7.2 Avaliação comportamental

5.7.2.1 Coordenação motora (Teste do *Rota-rod*)

O teste da barra rotatória ou *rota-rod* é um dos mais antigos empregados na área de estudo dos efeitos motores induzidos por uso de fármacos em estudos pré-clínicos (Pinto & Ko, 2012). Esse teste é considerado como triagem para detectar alterações neurológicas em termos de coordenação motora e equilíbrio produzido por drogas (Luszczki et al., 2005). Ele utiliza uma haste circular girando a uma velocidade constante e os animais colocados nesta haste tentam permanecer nela, em vez de cair em uma plataforma a cerca de 30 cm abaixo da haste (Dunham & Miya, 1957). Para evitar uma interpretação equivocada dos resultados, os animais foram submetidos ao treino na barra giratória 24h antes do experimento e os que permaneceram na barra por 60s, em pelo menos uma das três tentativas, foram selecionados para o teste (Almeida & Oliveira, 2006). Foi utilizado uma velocidade constante de 7,0 rpm e registrado o tempo de permanência dos animais na haste giratória, com até três reconduções ao aparelho

com limite máximo de 3 quedas, aos 60 min. após administração da substância. O tempo de permanência máximo permitido foi de 5 min. de duração (300s).

5.7.3 Atividade locomotora (Teste do Campo aberto)

A fim de verificar a atividade locomotora espontânea e comportamento exploratório dos animais, foi realizado o Teste do Campo Aberto, originalmente descrito por Hall e Ballachey (1932) para testar o efeito de um ambiente estranho sobre o estado emocional dos animais. O aparato do campo aberto consiste em uma arena circular confeccionada em acrílico transparente (30 cm x 30 cm) e piso de acrílico branco/opaco (30 cm x 30 cm x 15 cm), dividido em doze seções dispostas em dois círculos concêntricos. Após 60 min. do tratamento, os animais, um por vez, foram colocados no centro do campo aberto e, durante 5 min., foram avaliados o número de cruzamentos de linha com as quatro patas (atividade locomotora espontânea), número de comportamento de autolimpeza (*grooming*) e o número de levantamentos (*rearing*) (Archer, 1973). A base do aparelho foi limpa com solução de álcool 10% após cada teste para evitar os efeitos dos odores deixados pelos animais anteriores.

5.7.4 Avaliação laboratorial do sangue

Após os 28 dias de tratamento, no término do experimento para avaliação da toxicidade de doses repetidas, os animais dos grupos tratados com a droga e do grupo controle foram submetidos a jejum de 6h, anestesiados e submetidos a punção cardíaca para coleta de sangue e realização de exames hematológicos e bioquímicos.

As amostras de sangue foram colocadas em tubos contendo o anticoagulante ácido etilenodiamino tetracético (EDTA) para determinação dos parâmetros hematológicos e em tubos contendo gel separador (Microtainer Becton Dickson®) que, posteriormente, foram centrifugados por 10 min. a 3500 rpm para obtenção do soro que foi usado na determinação dos parâmetros bioquímicos.

5.7.4.1 Parâmetros hematológicos

Nas análises hematológicas, utilizando as amostras de sangue colhidas com EDTA, foram realizados o estudo da série vermelha (eritrograma), branca (leucograma) e contagem de plaquetas. O eritrograma contém a contagem de hemácias, o hematócrito, a hemoglobina,

volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM), e concentração da hemoglobina corpuscular média (CHCM). No leucograma foi realizado a contagem global e diferencial dos leucócitos. Estas determinações foram realizadas no analisador celular Urit 3000 Vet Plus e a contagem diferencial de leucócitos foi realizada por meio de esfregaços de sangue corado pela Giemsa observados em microscópio Olympus.

5.7.4.2 Parâmetros bioquímicos

Nas análises bioquímicas, utilizando as amostras de soro, foram realizadas as dosagens: uréia, creatinina, aspartato amino transferase (AST) e alanina amino transferase (ALT), fostatase alcalina, colesterol total, triglicerídios, ácido úrico, proteínas totais, albumina, magnésio, sódio e potássio, por métodos espectrofotométricos usando um analisador bioquímico automatizado Biossays 240 Plus. O sódio e o potássio foram determinados pelo analisador de íons seletivos Electrolyte WE300.

5.7.5 Exame anatomopatológico

Após eutanásia, cinquenta por cento dos animais do grupo tratado com o *o*-eugenol e do grupo controle foram autopsiados, submetidos a exames macroscópicos dos órgãos e colhidas amostras de fígado, pulmão, coração, rim, estômago, intestino delgado e encéfalo dos animais para estudos histopatológicos de órgãos, empregando-se técnica de inclusão em parafina e coloração em hematoxilina-eosina, para análise morfológica, semelhante ao relatado no item 5.6.3.

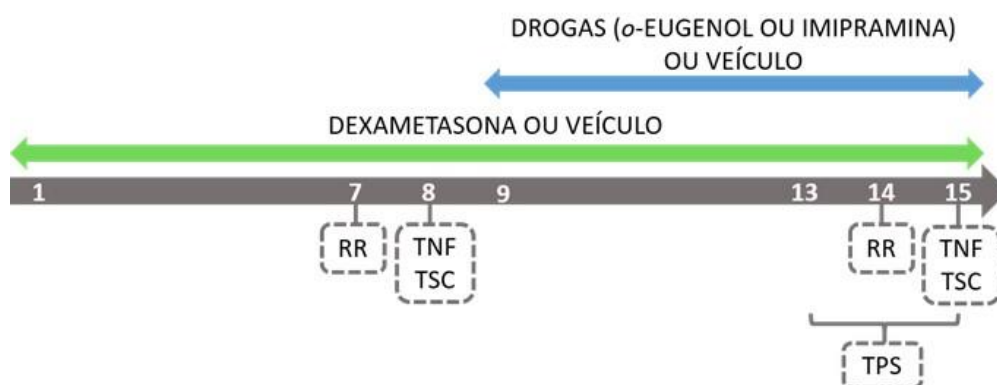
5.8 Indução da depressão experimental por administração repetida de dexametasona em camundongos e avaliação do efeito antidepressivo do *o*-eugenol

Foram estabelecidos protocolos modificados a partir dos estudos de Wróbel e colaboradores (2014; 2015) para indução do comportamento depressivo, utilizando para a administração em doses repetidas de dexametasona a metade da dose aguda usada nestes estudos.

O protocolo utilizou seis grupos ($n = 8$) e teve duração de 15 dias (Figura 11). Antes da administração de substâncias orais, os animais foram privados de água e ração por 2h. Durante 15 dias, um grupo de camundongos recebeu solução salina (grupo controle) e os demais receberam dexametasona 32 $\mu\text{g/kg}$ (s.c.). Nos últimos 7 dias, também foi administrado adici-

onalmente um tratamento 1h após a administração da dexametasona, protocolo semelhante ao usado por Lopes e colaboradores (2018) e Parente e colaboradores (2018).

Figura 11 – Esquema de tratamento dos animais.



Legenda: Os números representam os dias de tratamento e experimentos realizados. RR = *Rota-rod*, TNF = Teste do nado forçado, TSC = Teste de Suspensão da Cauda, TPS = Teste da Preferência por Sacarose.

Seis grupos foram formados: veículo + veículo (grupo controle); dexametasona + veículo (grupo dexametasona); dexametasona + imipramina 15 mg/kg (grupo da imipramina); dexametasona + *o*-eugenol 25 mg/kg (grupo *o*-eugenol 25 mg/kg); dexametasona + *o*-eugenol 50 mg/kg (grupo *o*-eugenol 50 mg/kg); e dexametasona + *o*-eugenol 100 mg/kg (grupo *o*-eugenol 100 mg/kg). O veículo se refere a solução de salina.

Para avaliar se a administração repetida de dexametasona poderia alterar a coordenação motora, no 7º dia foi realizado o teste do *rota-rod* do controle e todos os grupos que seriam posteriormente tratados com o *o*-eugenol. Ainda a fim de avaliar se a administração repetida de dexametasona (32 µg/kg, s.c) induz comportamento do tipo depressivo em camundongos fêmeas, no 8º dia, a imobilidade dos animais foi avaliada nos testes de suspensão pela cauda e nado forçado no grupo programado a ser tratado apenas com dexametasona durante o experimento e o controle. No 14º dia repetiu-se o *rota-rod* e no 15º dia, foram registrados os testes de suspensão da cauda, nado forçado e preferência por sacarose. Todos os testes foram realizados 1h após a última administração das substâncias.

Após os testes, os animais foram eutanasiados por decapitação para retirada do hipocampo e do córtex pré-frontal, removidos e congelados a -80°C para a análise neuroquímica. Em um dos experimentos, houve a coleta de sangue através da sangria proporcionada pela decapitação do animal. O soro obtido da coleta de sangue foi destinado para a determinação dos níveis de citocina pró-inflamatória.

5.8.1 Avaliação do comportamento tipo depressivo

5.8.1.1 Teste do nado forçado (TNF)

O teste de natação foi realizado para avaliar o comportamento de desespero dos camundongos e semelhante ao descrito anteriormente por Porsolt et al. (1977). Este teste é simples de conduzir de forma confiável e requer o mínimo de equipamento especializado (Can et al., 2012). Os animais foram forçados a nadar individualmente em um cilindro de vidro transparente (25 cm de altura x 12 cm diâmetro) contendo 2/3 (dois terços) de água cheio de água mantida a temperatura ambiente ($24 \pm 1^\circ\text{C}$). Os camundongos foram cuidadosamente colocados na água e forçados a nadar por 5 min., e a latência de imobilidade e o tempo de imobilidade foram registrados durante esse período. A duração da imobilidade foi considerada como o tempo gasto pelo animal flutuando na água sem se debater e realizar apenas os movimentos necessários para manter a cabeça acima da água.

5.8.1.2 Teste de Suspensão da Cauda (TSC)

O teste de suspensão da cauda consiste em submeter o animal a uma situação estressante e inescapável, que predispõe o animal a desenvolver comportamentos tipo de desespero comportamental e desamparo, alternando comportamentos entre agitação e imobilidade. Este ensaio comportamental foi realizado através de adaptação feita ao teste inicialmente proposto por Stéru e colaboradores (1985). O animal foi suspenso por sua cauda, de maneira que fique impedido de tocar o chão ou escapar, podendo apresentar um estresse vindo pela tentativa de fuga ou a motivação para continuar tentando. No momento em que o animal desiste da fuga, ele apresenta uma postura imóvel, sendo este a expressão do comportamento depressivo. Os camundongos foram suspensos pela cauda à 50 cm do chão e presos com fita adesiva do tipo crepe, cuidadosamente 1 cm da ponta da cauda, com porção ventral voltada para a câmera de registros. Cada animal permaneceu nesta posição durante 5 min. Foram analisados os parâmetros de latência para imobilidade e tempo total de imobilidade.

5.8.1.3 Teste da Preferência por Sacarose (TPS)

O teste de preferência de sacarose (TPS) foi realizado para avaliar a anedonia (a incapacidade de sentir prazer), um dos sintomas característicos da depressão maior. O teste foi

realizado como descrito por Mao et al. (2014) com modificações, baseado na escolha de duas garrafas, onde uma redução na razão de preferência de sacarose em roedores experimentais é indicativa de anedonia. Primeiro, os camundongos foram treinados para se adaptar a uma solução de sacarose (2%, p/v) colocando-se dois frascos de uma solução de sacarose em cada gaiola por 18 h. Após a adaptação, os camundongos tiveram uma das garrafas substituída por água por 18h. O volume de cada garrafa correspondera a 100 ml. O teste foi realizado no período da noite sem privação de comida. A preferência de sacarose foi calculada como a porcentagem do consumo de sacarose em relação ao consumo total de líquido de acordo com a Equação (1):

$$\text{Preferência por sacarose (\%)} = \left(\frac{\text{consumo de sacarose (mL)}}{[\text{consumo de sacarose (mL)} + \text{consumo de água (mL)}]} \right) \times 100 \quad (1)$$

5.8.2 Avaliação da coordenação motora pelo *rota-rod*

O teste foi realizado 1h após a administração da droga em estudo e conforme metodologia descrita no item 5.7.2.1.

5.9 Teste de limite de convulsões induzidas por pentilenotetrazol

O efeito do *o*-eugenol no limiar de convulsões foi avaliado através do modelo de convulsões induzidas por pentilenotetrazol (PTZ). Grupos de animais (n = 8) foram pré-tratados com veículo (solução salina 0,9%), ou imipramina (30 mg/kg), ou com uma dose de *o*-eugenol (25, 50 e 100mg/kg) por v.o. de administração. Após 1h, cada animal recebeu uma dose subconvulsivante de 35 mg/kg de PTZ i.p.; um grupo distinto recebeu solução salina e PTZ 70 mg/kg i.p. como controle. A latência para o início da primeira convulsão tônico-clônica (em segundos) foi registrada (Loscher et al., 1991, Monteiro et al., 2020). O tempo total de observação foi de 30 min. e uma latência de 1.800s foi registrada para experimentos nos quais não ocorreu convulsão tônico-clônica.

5.10 Sinergismo do *o*-eugenol com a imipramina

Foi realizado um experimento de sinergismo com a menor dose do *o*-eugenol, agora em dose única, para verificar se junto do medicamento antidepressivo clássico em baixa dose o efeito antidepressivo seria potencializado. Foram formados seis grupos: 1) veículo + veículo

(grupo controle), 2) dexametasona + veículo (grupo dexametasona), 3) dexametasona + imipramina (5 mg/kg), 4) dexametasona + imipramina (15 mg/kg), 5) dexametasona + *o*-eugenol (25 mg/kg), 6) dexametasona + *o*-eugenol (25 mg/kg) + imipramina (5 mg/kg). Os grupos de camundongos (n=8) foram previamente tratados com dexametasona (64 µg/kg s.c), transcorrido 3 h receberam por via oral veículo ou dose subefetiva de *o*-eugenol (25 mg/kg), ou dose subefetiva de imipramina (5 mg/kg) ou imipramina 15 mg/kg. Em outro grupo ainda, após 3h do tratamento com a dexametasona, foram administrados imipramina (5 mg/kg) e, após 15 min., *o*-eugenol (25 mg/kg). Depois de 1h das administrações por v.o., os camundongos foram expostos ao teste do nado forçado (Abbasi-Maleki & Mousavi, 2017). Um grupo controle foi tratado apenas com o veículo (solução salina 0,9%).

5.11 Ensaios neuroquímicos

5.11.1 Determinação de parâmetros de estresse oxidativo

5.11.1.1 Determinação do nível de peroxidação lipídica

A peroxidação lipídica, utilizando o hipocampo dos camundongos, foi analisada pela determinação da concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARs), um índice de peroxidação lipídica amplamente adotado, de acordo com o método descrito por Draper e Hadley (1990). Um homogenato do hipocampo (10% p/v) em 1,15% p/v de tampão de cloreto de potássio foi preparado. De forma resumida, as amostras foram misturadas com 1 ml de solução tricloroacética ácido (10%) e 1 ml de ácido tiobarbitúrico (0,6%). A mistura incubada em banho-maria (95-100° C) por 15 min. e *n*-butanol (2:1 v/v) foi adicionado ao meio e a mistura centrifugada (800 xg para 15 min.) para remover o precipitado. A absorbância da cor rosa desenvolvida foi medida espectrofotometricamente a 535 nm. Os valores de absorbância foram interpolados em uma curva padrão de malondialdeído (MDA), e o resultado expresso em mg de MDA/g de amostra.

5.11.1.2 Determinação da concentração de glutathiona reduzida (GSH)

O córtex pré-frontal dos camundongos foi usado para a determinação de GSH, um antioxidante natural não enzimático. Esse teste utilizará a metodologia de Sedlak e Lindsay (1968), baseado na reação do reagente de Ellman (DTNB - ácido 5,5-ditio-bis-(2-

nitrobenzóico)), com os grupos tióis. O córtex pré-frontal foi homegeinizado em EDTA 0,02M (10%) e misturado com solução de ácido tricloroacético (50%). Em seguida, as amostras serão centrifugadas (3000 rpm/15 min.) e o sobrenadante foi coletado e misturado com tampão HCl (0,4M; pH 8.9) e DTNB (0,01 M). A concentração de GSH foi expressa em μg de GSH/g tecido e determinada por espectrofotometria a 412 nm.

5.11.2 Determinação dos níveis de IL-1 β

Os níveis de interleucina1- β (IL-1 β) em amostras de soros dos animais submetidos aos testes comportamentais foram quantificados usando kit comercial de ensaio imunoenzimático ELISA (Sigma-Aldrich) em camundongos seguindo as instruções fornecidas pelo fabricante. Resumidamente, após os reagentes e amostras terem sido restaurados à temperatura ambiente, 100 μL de cada amostra ou padrão foram adicionados aos poços de uma microplaca sequencialmente e misturados suavemente. Após incubação durante 2,5h em temperatura ambiente, as amostras em cada poço foram lavadas quatro vezes utilizando o tampão de lavagem. A cada poço, foram adicionados 100 μL de anticorpo de detecção e incubados por 1h a temperatura ambiente. Depois do mesmo procedimento anterior de lavagem, teve a adição de 100 μL solução de estreptavidina a cada poço e incubação por 45 min. em temperatura ambiente. Novamente foi realizada uma lavagem e, posteriormente, adicionado 100 μL de reagente de substrato a cada poço, 30 min. de incubação a temperatura ambiente, até a reação ser interrompida pela adição de 50 μL de tampão de parada. A absorbância a 450 nm foi medida em leitor de placas (Biotek, EUA). A quantidade de IL-1 β foi calculada a partir de curvas padrão e expressa como picogramas por mililitro (pg/ml).

5.11.3 Metabolômica por ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H

O estudo metabolômico foi feito com as amostras de hipocampo de camundongos pela técnica de ressonância magnética nuclear (RMN) e utilizando o método proposto por Wu et al. (2020), com modificações. No dia da análise, as amostras congeladas a $-80\text{ }^\circ\text{C}$ foram descongeladas, adicionando HCl/metanol (60%, v/v). A mistura foi homogeneizada usando o vortex por 90 s. Em seguida, o homogeneizado foi centrifugado e o sobrenadante foi coletado. Este procedimento de extração foi repetido duas vezes com etanol a 60% e o sobrenadante foi retido. Os sobrenadantes foram totalmente secos sob corrente de nitrogênio gasoso a temperatura ambiente. Posteriormente, os produtos foram redissolvidos em tampão fosfato com D_2O e

TMSP, como padrão interno. A solução foi misturada em vortex e centrifugada. Cerca de 500 μL do sobrenadante foi colocado em um tubo de RMN (5 mm) para análise espectral de RMN de ^1H . Os espectros unidimensionais de RMN de ^1H foram medidos a uma temperatura de 300K em um espectrômetro Bruker (Bruker ASCEND 400 MHz; Bruker, Coventry, Reino Unido).

Os espectros foram obtidos com os seguintes parâmetros: número de varreduras: 128, domínio de tempo: 25K, varredura Dummer: 16, tempo de aquisição: 0,8 s, janelas espectrais de 40 ppm e d20: 0,8 ms. Apodização com uma linha exponencial equivalente a 0,8 Hz foi aplicada aos FIDs. Deslocamentos químicos para todas as amostras foram referenciados ao TPS (ácido 3-(trimetilsilil) propiônico-2,2,3,3-d₄) a 0,00 ppm.

5.12 Gravação e análise dos vídeos

Todos os testes comportamentais foram gravados utilizando uma câmera digital. Após a renomeação dos vídeos, esses foram analisados por cegamento ou de forma que o grupo de tratamento não possa ser identificado antes da conclusão da análise. Os dados foram então tabulados para análises estatísticas.

5.13 Análise estatística

A normalidade de distribuição dos dados foi verificada pelo teste de Shapiro-Wilk. Os resultados que obedeceram a uma distribuição paramétrica foram representados como médias $\pm$ erro padrão da média (e.p.m.) e submetidos ao teste “t” de Student não-pareado ou a uma Análise de Variância (ANOVA) *one-way* ou *two-way*, seguido pelo teste *post hoc* de Tukey, conforme indicado. Um valor $p < 0,05$ foi considerado para indicar significância estatística. Para os resultados que não obedeceram a uma distribuição paramétrica foram expressos como mediana (mínimo-máximo) e avaliado por Kruskal-Wallis seguido pelo teste *post hoc* de Dunn. Os dados numéricos foram aplicados no programa GraphPad Prism 9.0 versão gratuita (GraphPad Software Incorporated, San Diego, USA).

O processamento dos espectros foi realizado usando o *software* TopSpin 4.1.1 (Bruker). Os espectros de RMN referenciados, correção de linha de base, correção de fase e alinhamento, o pico de água em 5,07–4,60 ppm foi removido, normalizado pela área total do espectro e, finalmente, o espectro foi obtido por *binning* com uma faixa de 0–9 ppm e com bins de 0,025 ppm. A análise estatística foi realizada usando o *MetaboAnalyst 6.0*, os dados obtidos do espectro de *binning* foram submetidos à normalização por área e o PCA (Análise de Componentes Principais) foi obtido com validação cruzada.

6 RESULTADOS

6.1 Estudo da toxicidade *in silico*

De acordo com a regra de Lipinski, um composto é considerado provável de possuir boa absorção oral se atender a certos critérios, como um peso molecular abaixo de 500 Da, um log P (coeficiente de partição octanol-água) não superior a 5, um número de doadores de ligações de hidrogênio não superior a 5 e um número de aceptores de ligações de hidrogênio não superior a 10. O *o*-eugenol atendeu a esses critérios (Tabela 1).

Tabela 1- Parâmetros de Lipinski do *o*-eugenol.

Peso Molecular g/mol	LogP	Número de Aceptores de Hidrogênio	Número de Doadores de Hidrogênio
164,20	2,12	2	1

Fonte: Dados da pesquisa (2024).

Quanto a permeabilidade em células Caco-2, o *o*-eugenol apresentou valores superiores a 0,90, com permeabilidade considerável. Apresentou uma taxa de absorção de 94%, além de um valor de log Kp evidenciado por valores próximos ao considerado alto (log Kp > -2,5) que sugere um considerável potencial para administração transdérmica (Pires et al., 2015). Também não demonstrou ser potencial substratos de glicoproteínas (Tabela 2).

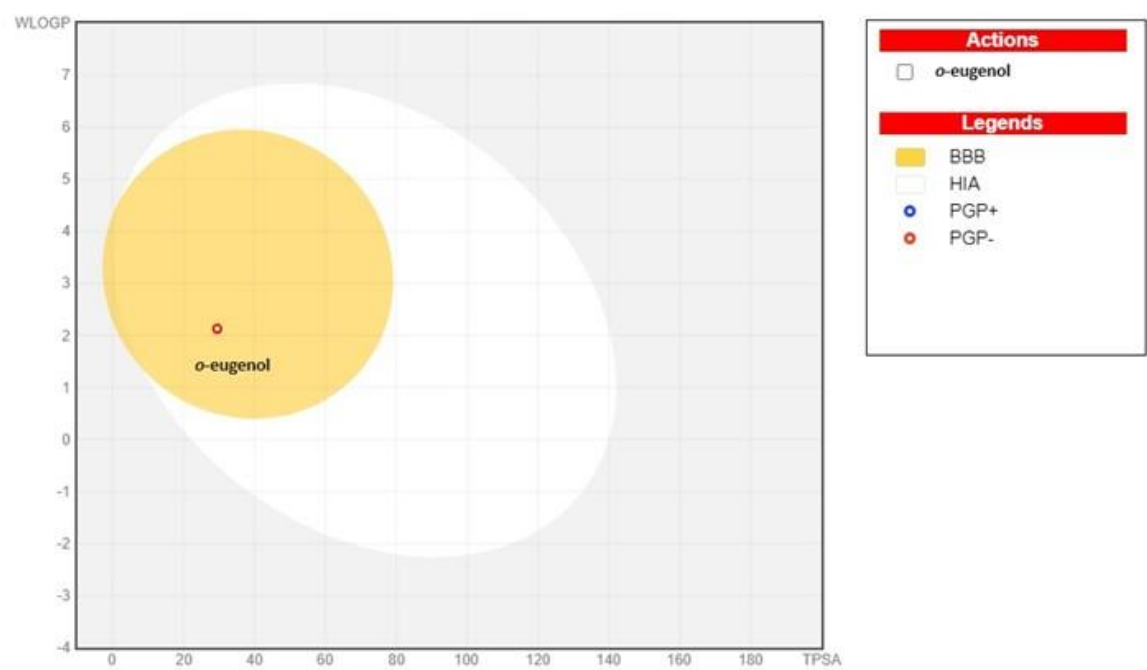
Tabela 2 - Parâmetros Farmacocinéticos – Absorção.

Absorção	<i>o</i> -Eugenol
Permeabilidade em Caco-2 (log Papp em 10 ⁻⁸ cm/s)	1,342
Absorção Intestinal (%)	93,773
Permeabilidade Cutânea (log Kp)	-2,735
Substrato de Glicoproteína P	No

Fonte: Dados da pesquisa (2024).

No modelo de previsão baseado no ovo cozido, ou "*boiled-eggs*", observa-se que a molécula demonstrou uma absorção intestinal satisfatória, além de atingir o Sistema Nervoso Central (SNC) pela capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica (Figura 12).

Figura 12 - Modelo preditivo *boiled-eggs* para o *o*-eugenol.



Fonte: Dados da pesquisa obtidos pela Plataforma SwissADME (2024).
Legenda: BBB: barreira hematoencefálica, HIA: absorção gastrointestinal, PGP (+) substrato da glicoproteína P, PGP (-) não substrato da glicoproteína P. WlogP e TPSA: área de superfície polar topográfica. (Daina et al., 2017; Daina & Zoete, 2016).

Quanto a distribuição, os achados revelam que o *o*-eugenol demonstra um considerável volume de distribuição no estado estacionário (VDss), evidenciado por valores próximos ao considerado alto ($\log L/kg > 0,45$), juntamente com uma significativa capacidade de permeação no cérebro ($\log BB > 0,3$) e significativa capacidade de permeação no cérebro, já que compostos com $\log PS > -2$ tem alta penetração no cérebro (Tabela 3).

Tabela 3 – Parâmetros Farmacocinéticos – Distribuição.

Distribuição	o-Eugenol
VDss (log L/kg)	0,404
Permeabilidade Barreira Hematoencefálica (log BB)	0,435
Permeabilidade Sistema Nervoso Central (log PS)	-2,035

Fonte: Dados da pesquisa (2024).

Na Tabela 4, evidencia que o *o*-Eugenol não é substrato de nenhuma das isoformas, exceto, a CYP1A2, atuando como inibidor enzimático.

Tabela 4 - Parâmetros Farmacocinéticos – Metabolismo.

Metabolismo	<i>o</i> -Eugenol
CYP2D6 (Substrato)	Não
CYP3A4 (Substrato)	Não
CYP1A2 (Inibidor)	Sim
CYP2C19 (Inibidor)	Não
CYP2C9 (Inibidor)	Não
CYP2D6 (Inibidor)	Não
CYP3A4 (Inibidor)	Não

Fonte: Dados da pesquisa (2024).

Por fim, os resultados obtidos (Tabela 5) demonstram a ausência de toxicidade no modelo AMES, bem como a falta de inibição nos canais Herg. Também sugere não haver possível toxicidade sistêmica e mostrou-se preditivamente como potencial sensibilizante da pele.

Tabela 5 - Modelos preditivos *in silico* de potenciais respostas tóxicas do *o*-eugenol.

Toxicidade	<i>o</i> -Eugenol
AMES Toxicidade	Não
hERG 1 Inibidor	Não
hERG 2 inibidor	Não
Hepatotoxicidade	Não
Sensibilização da pele	Sim

Fonte: Dados da pesquisa (2024).

6.2 Estudo da toxicidade aguda

6.2.1 Estimativa da Dose Letal

O *o*-Eugenol por via oral na dose de 300 mg/kg (n= 6) não promoveu a mortalidade dos camundongos no período de 14 dias de observações, obtendo o mesmo resultado após repetição com a mesma dose, utilizando o total de 6 animais. Um teste foi feito com a dose de 2.000 mg/kg (n= 3) e promoveu a morte de 2 animais (Tabela 6). De acordo com os resultados, a estimativa da DL₅₀ é de 1.000 mg/kg, classificada como categoria 4 do Sistema Globalmente Harmonizado (300 < Categoria 4 ≤ 2000 mg/kg), segundo os critérios do protocolo experimental (OECD, 2001).

Tabela 6 – Percentual de mortes em 14 dias em diferentes doses do orto-eugenol.

Doses do <i>o</i> -eugenol (mg/kg)	% de mortes em 14 dias
2000	66,67
300	0,00

Fonte: Dados da pesquisa (2024).

6.2.2 Efeitos na triagem farmacológica comportamental do *o*-eugenol

Os resultados obtidos a partir da triagem farmacológica comportamental do *o*-eugenol na dose de 300 mg/kg (n=6) e 2.000 mg/kg (n=3) por via oral estão apresentados nas Tabelas 7 e 8.

Diferentes comportamentos em relação ao controle foram observados com a utilização das doses do *o*-Eugenol. Com a administração de 300 mg/kg (Tabela 7), os animais apresentaram ambulação diminuída durante as 4h iniciais de observação. Outras alterações comportamentais, durante as primeiras 2h de observação, foram a presença de analgesia, perda do reflexo auricular, perda do reflexo corneal, ptose palpebral e a resposta ao toque diminuída. Vale ressaltar, que esses sintomas estiveram presentes, mas foi de forma discreta nesta dose.

Tabela 7 – Efeitos observados do *o*-eugenol de dose 300 mg/kg na triagem farmacológica comportamental / efeito presente (+), efeito intenso (++), efeito diminuído (-), sem efeito (0).

Atividade farmacológica do <i>o</i> -eugenol 300 mg/kg via oral	Tempo em observação				
	Até 30 min	1h	2h	3h	4h
Ambulação diminuída	+	+	+	+	+
Analgesia	+	+	0	0	0
Perda do reflexo auricular	+	+	0	0	0
Perda do reflexo corneal	+	+	0	0	0
Ptose palpebral	+	+	0	0	0
Resposta ao toque diminuída	+	+	+	0	0

Já com a administração de 2.000 mg/kg (Tabela 8), foi observado maior quantidade de alterações comportamentais no animal que sobreviveu ao uso dessa dose e boa parte dessas alterações apresentaram-se de forma intensa. Entre os efeitos apresentados, estão analgesia, resposta ao toque diminuída, perda do reflexo corneal, perda do reflexo auricular, ambulação diminuída e abdução das patas do trem posterior. O animal sobrevivente permaneceu com as alterações comportamentais presentes em 2h até às 4h iniciais de observação após a substância ser administrada e, posteriormente, foi melhorando de forma gradativa e com 24h estava aparentemente sem alterações.

Tabela 8 – Efeitos observados do orto-eugenol de dose 2.000 mg/kg na triagem farmacológica comportamental / efeito presente (+), efeito intenso (++) , efeito diminuído (-), sem efeito (0).

Atividade farmacológica do o-eugenol 2.000 mg/kg via oral	Tempo em observação	
	Até 30 min	1h
Tremores	++	+
Hipnose	+	+
Ptose palpebral	+	+
Sedação	+	+
Anestesia	+	+
Ataxia	+	+
Reflexo do endireitamento diminuído	+	+
Analgesia	++	++
Resposta ao toque diminuída	+	+
Perda do reflexo corneal	++	++
Perda do reflexo auricular	++	++
Ambulação diminuída	++	++
Contorções abdominais	++	+
Abdução das patas do trem posterior	++	++
Constipação	++	++
Respiração forçada	++	++
Força para agarrar	-	-
Morte	0	0

Nota: No tempo de observação de 2h, ocorreu a morte de 2/3 dos animais, não permitindo a observação dos demais efeitos.

De acordo com os efeitos comportamentais observados na triagem farmacológica, provavelmente, a substância apresenta efeito depressor do sistema nervoso central nas doses de 300 e 2.000 mg/kg. Logo, houve o seguimento para testes que nos permitiu avaliar a atividade antidepressiva em doses menores.

6.2.3 Consumo de água, ração e avaliação ponderal

Os resultados da Tabela 9 demonstram que não houve diferença significativa no consumo de água e ração diários dos camundongos nos grupos avaliados durante os 14 dias de experimento.

Tabela 9 – Consumo de água e ração de camundongos, fêmeas, tratadas com o-eugenol na dose de 300 mg/kg durante os 14 dias do ensaio de toxicidade aguda.

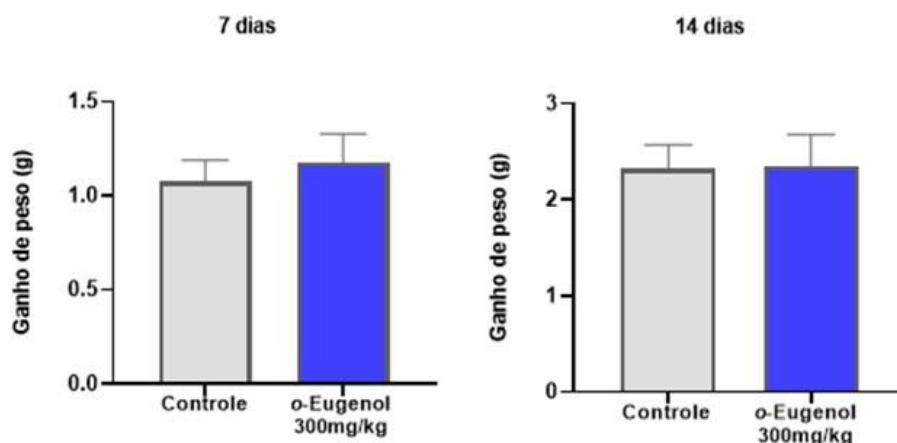
Parâmetros	Controle	o-Eugenol 300 mg/kg
Consumo de água (ml)	65,46±3,74	65,28±3,77
Consumo de ração (g)	33,21±0,52	35,15±0,78

Nota: Os valores estão expressos em média ± erro padrão da média (e.p.m) do consumo diário de água ou ração dos animais, durante 14 dias por grupo (n = 6). Teste “t” de Student não-pareado. Considerado como significativo $p < 0,05$.

Na utilização da dose de 2.000 mg/kg de *o*-Eugenol, o animal sobrevivente teve baixo consumo de água e ração nos primeiros dias, sendo posteriormente aumentado no decorrer dos 14 dias. O consumo de água variou de 6 a 16 ml e o consumo de ração variou de 2,73 a 6,93 g, ambos durante todo o período.

Em relação ao ganho de massa corpórea, não houve diferença significativa entre os grupos controle ($1,07 \pm 0,11$; $2,32 \pm 0,26$) e *o*-Eugenol na dose de 300 mg/kg ($1,17 \pm 0,15$; $2,35 \pm 0,33$) por via oral após 7 e 14 dias, respectivamente (Figura 13). Enquanto, o animal sobrevivente na dose de 2.000 mg/kg de *o*-Eugenol, teve uma redução de 0,7 g do peso inicial em 7 dias e um aumento de 2,8 g do peso inicial em 14 dias.

Figura 13 – Ganho de peso de camundongos, fêmeas, tratadas com a dose de 300 mg/kg de *o*-eugenol e do controle, após 7 e 14 dias do início do ensaio de toxicidade aguda.



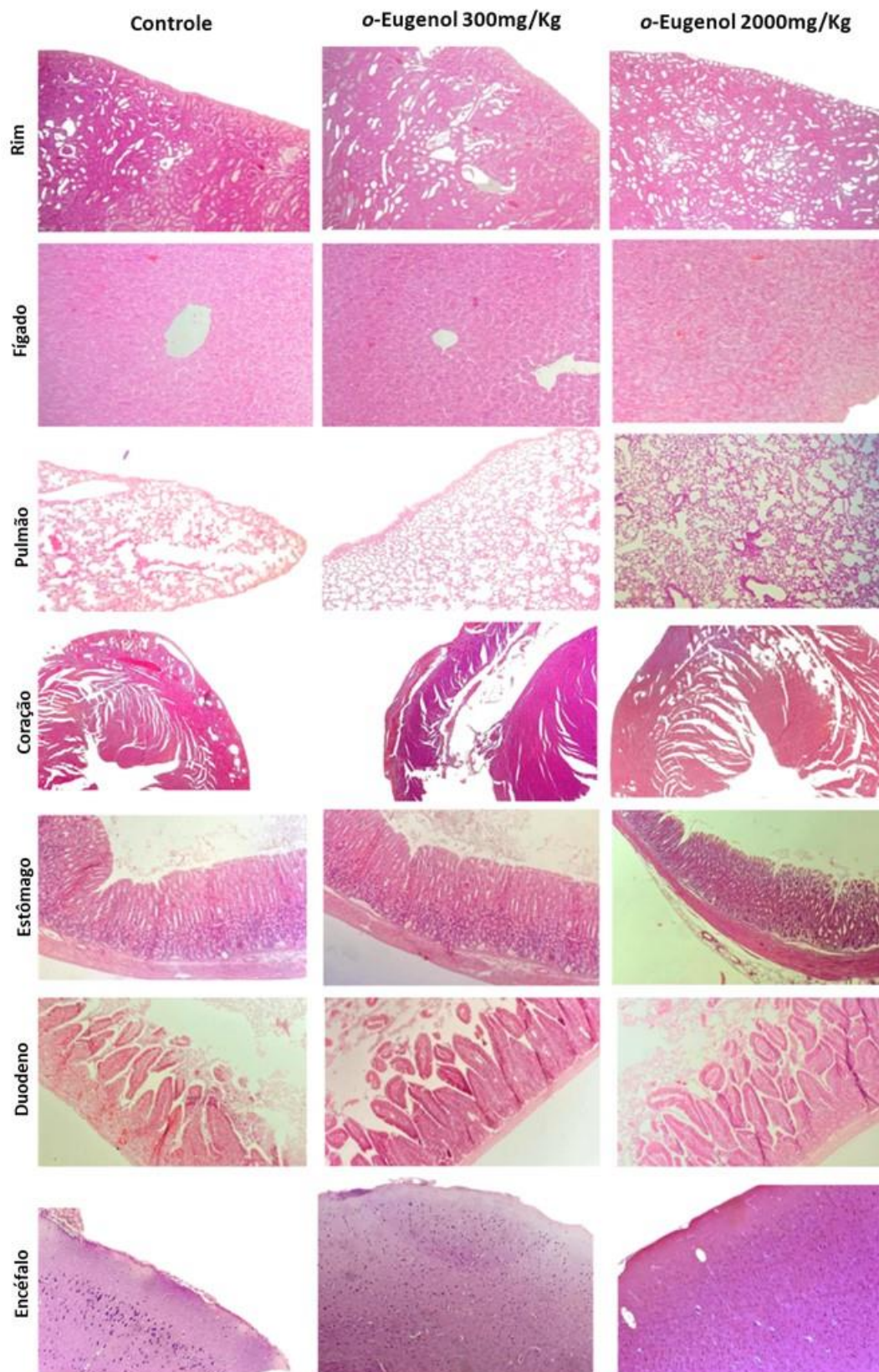
Nota: Os valores estão expressos em média $\pm$ erro padrão da média (e.p.m) (n = 6). Teste “t” de Student não-pareado. Considerado como significativo $p < 0,05$.

6.2.4 Exame anatomopatológico

Na avaliação da análise morfológica macroscópica não houve alteração em nenhum dos órgãos avaliados. Na avaliação histopatológica, não foram observadas alterações morfológicas, inflamatórias ou degenerativas nos tecidos examinados dos órgãos estudados dos camundongos tratados com as doses de 300 mg/kg e 2.000 mg/kg em relação ao controle.

Os cortes histológicos foram analisados pela coloração hematoxilina-eosina em microscópio óptico. Na Figura 14 pode-se evidenciar cortes histológicos dos órgãos avaliados de cada grupo, na qual não houve alterações significativas nos parâmetros estudados.

Figura 14 – Fotomicrografias do rim, fígado e pulmão dos grupos experimentais do estudo de toxicidade aguda do *o*-eugenol.



Nota: Coloração hematoxilina-eosina. Aumento: 100X. Sem alterações histopatológicas significativas.

6.3 Ensaios toxicológico não-clínico de doses repetidas

6.3.1 Consumo de água, ração e avaliação ponderal

Os resultados da Tabela 10 mostram que não houve diferença significativa no consumo total de água e ração semanais dos camundongos (fêmeas) dos grupos ($n = 6$) avaliados durante os 28 dias de experimento do ensaio de toxicidade em doses repetidas. Também não foram observados sinais tóxicos ou alterações comportamentais durante os dias de tratamento nos camundongos no decorrer do ensaio.

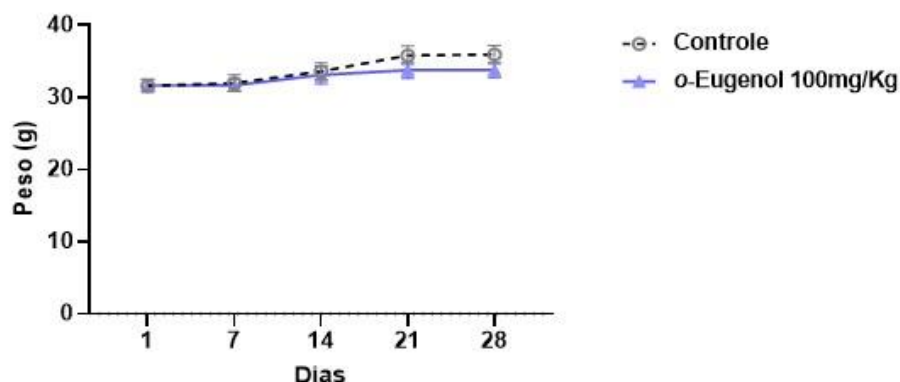
Tabela 10 – Consumo de água e ração semanais de grupos de camundongos, fêmeas, tratadas com *o*-eugenol em doses repetidas de 100 mg/kg durante os 28 dias do ensaio de toxicidade de doses repetidas.

Parâmetros	Controle	<i>o</i> -Eugenol 300 mg/kg
Consumo de água (ml)	353,3±11,81	326,3±10,68
Consumo de ração (g)	224,3±5,04	216,7±4,00

Nota: Os valores estão expressos em média $\pm$ erro padrão da média (e.p.m) ($n = 6$).
Teste “t” de Student não-pareado. Considerado como significativo $p < 0,05$.

A interação entre tempo e tratamento não apresentou diferença significativa entre os grupos controle e tratados com o *o*-eugenol 100 mg/kg. Ambos os grupos aumentaram seu peso, mas em magnitude semelhante, sem diferenças significativas entre os tratamentos (Figura 15).

Figura 15 – Evolução ponderal dos camundongos tratados com *o*-Eugenol 100 mg/kg e do grupo controle.



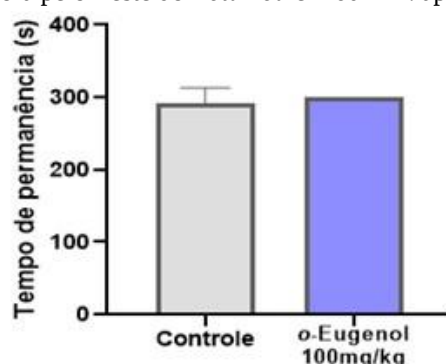
Nota: Os valores expressos em média $\pm$ erro padrão da média (e.p.m) ($n = 6$). ANOVA two way seguido de Tukey. Considerado como significativo $p < 0,05$.

6.3.2 Avaliação comportamental

6.3.2.1 Teste do *Rota-rod*

O tratamento com doses repetidas do *o*-eugenol 100 mg/kg ($300,0 \pm 0,0$) não alterou o tempo de permanência sobre a barra giratória em 60 min. após a administração da última dose do *o*-eugenol quando comparado ao controle ($298,8 \pm 1,2$) (Figura 16).

Figura 16 – Efeito da administração repetida do *o*-eugenol por 28 dias na coordenação motora pelo Teste do *Rota-rod* em 60 min. após sua administração.

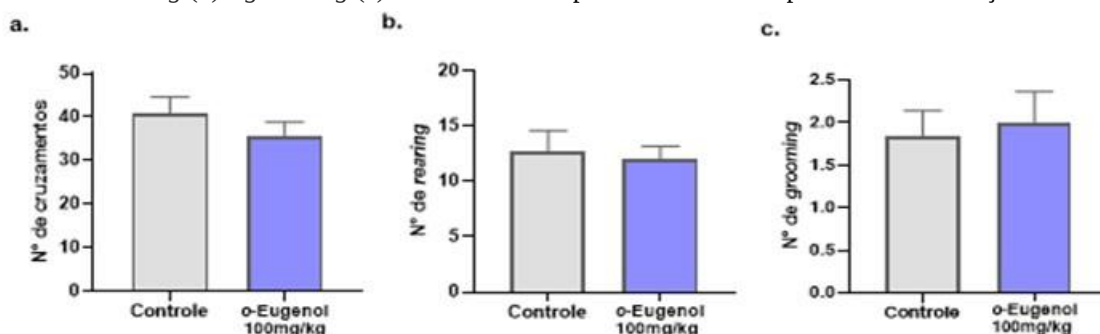


Nota: Cada coluna representa média $\pm$ erro padrão da média (e.p.m) ($n = 6$). Teste “t” de Student não-pareado. Considerado como significativo $p < 0,05$.

6.3.2.2 Campo aberto

No teste do Campo Aberto, o grupo tratado com *o*-eugenol 100 mg/kg não apresentou diferença significativa no número de cruzamentos ($40,8 \pm 3,7$ vs. $35,5 \pm 3,3$; Figura 17a), rearing ($12,6 \pm 1,9$ vs. $12,0 \pm 1,1$; Figura 17b) ou grooming ($1,8 \pm 0,3$ vs. $2,0 \pm 0,3$; Figura 17c) em relação ao controle.

Figura 17 – Efeito da administração repetida do *o*-eugenol por 28 dias no número de cruzamentos (a), rearing (b) e grooming (c) no Teste do Campo Aberto 60 min. após sua administração.



Nota: Cada coluna representa média $\pm$ erro padrão da média (e.p.m) ($n = 6$). Teste “t” de Student não-pareado. Considerado como significativo $p < 0,05$.

6.3.3 Avaliação laboratorial do sangue

6.3.3.1 Parâmetros hematológicos

A Tabela 11 apresenta resultados da avaliação dos parâmetros hematológicos das fêmeas após 28 dias de tratamento com *o*-eugenol. No grupo tratado com *o*-eugenol houve uma diminuição significativa da Hemoglobina Corpuscular Média (HCM) em relação ao controle. Demais parâmetros avaliados não tiveram alterações significativas.

Tabela 11 – Parâmetros hematológicos obtidos do sangue de camundongos Swiss, fêmeas, tratadas com *o*-eugenol 100 mg/kg durante os 28 dias consecutivos.

Parâmetros	Controle	<i>o</i> -Eugenol 100 mg/kg
Hemácias (10^6 /mm ³)	7,94 ± 0,37	8,324 ± 0,17
Hemoglobina (g/dl)	13,93 ± 0,47	13,96 ± 0,62
Hematócrito (%)	43,42 ± 2,48	45,22 ± 1,18
VCM (fl)	54,78 ± 0,63	54,38 ± 0,89
HCM (pg)	17,43 ± 0,26	16,72 ± 0,45**
CHCM (%)	32,10 ± 0,98	30,82 ± 0,93
Leucócitos (10^3 /mm ³)	5,167 ± 2,25	5,067 ± 1,38
Neutrófilos (%)	18,67 ± 3,50	18,83 ± 1,94
Linfócitos (%)	78,83 ± 3,76	79,33 ± 2,07
Monócitos (%)	2,50 ± 0,55	1,83 ± 0,75
Plaquetas (10^3 /mm ³)	1031 ± 154,40	1101 ± 103,00

Nota: Os valores estão expressos em média ± erro padrão da média (e.p.m) (n = 6).
Teste “t” de Student não-pareado. **p < 0,01 *versus* o controle.

6.3.3.2 Parâmetros bioquímicos

Os resultados dos parâmetros bioquímicos obtidos estão contidos na Tabela 12. Não foi verificada alteração da maioria dos parâmetros bioquímicos avaliados dos camundongos tratados com *o*-eugenol 100 mg/kg durante os 28 dias consecutivos. No entanto, foi verificada uma redução significativa de ALT do grupo tratado com *o*-eugenol 100 mg/kg em relação ao grupo controle, além de um aumento significativo do triglicerídeos entre esses grupos. Os resultados obtidos para os parâmetros uréia, creatinina, AST, fosfatase alcalina, colesterol, ácido úrico, proteínas totais, albumina, magnésio, sódio e potássio não tiveram diferenças significativas entre os grupos.

Tabela 12 – Parâmetros bioquímicos obtidos de soro de camundongos Swiss, fêmeas, tratadas com *o*-eugenol 100 mg/kg durante os 28 dias consecutivos.

Parâmetros	Controle	<i>o</i> -Eugenol 100 mg/kg
Uréia (mg/dl)	40,88 ± 2,13	40,43 ± 3,71
Creatinina (mg/dl)	0,51 ± 0,08	0,31 ± 0,04
ALT (U/l)	55,33 ± 3,07	45,67 ± 2,55*
AST (U/l)	91,40 ± 6,73	78,00 ± 7,50
Fosfatase alcalina (U/l)	161,2 ± 11,99	146,3 ± 4,99
Colesterol (mg/dl)	115,0 ± 6,16	110,5 ± 3,98
Triglicerídeos (mg/dl)	132,1 ± 11,01	176,7 ± 7,92**
Ácido úrico (mg/dl)	2,6 ± 0,52	2,58 ± 0,55
Proteínas totais (g/dl)	4,65 ± 0,14	4,50 ± 0,23
Albumina (g/dl)	2,63 ± 0,09	2,42 ± 0,08
Magnésio (mg/dl)	3,12 ± 0,15	2,75 ± 0,11
Sódio (mmol/l)	149,2 ± 0,78	149,1 ± 1,65
Potássio (mmol/l)	4,91 ± 0,13	4,75 ± 0,12

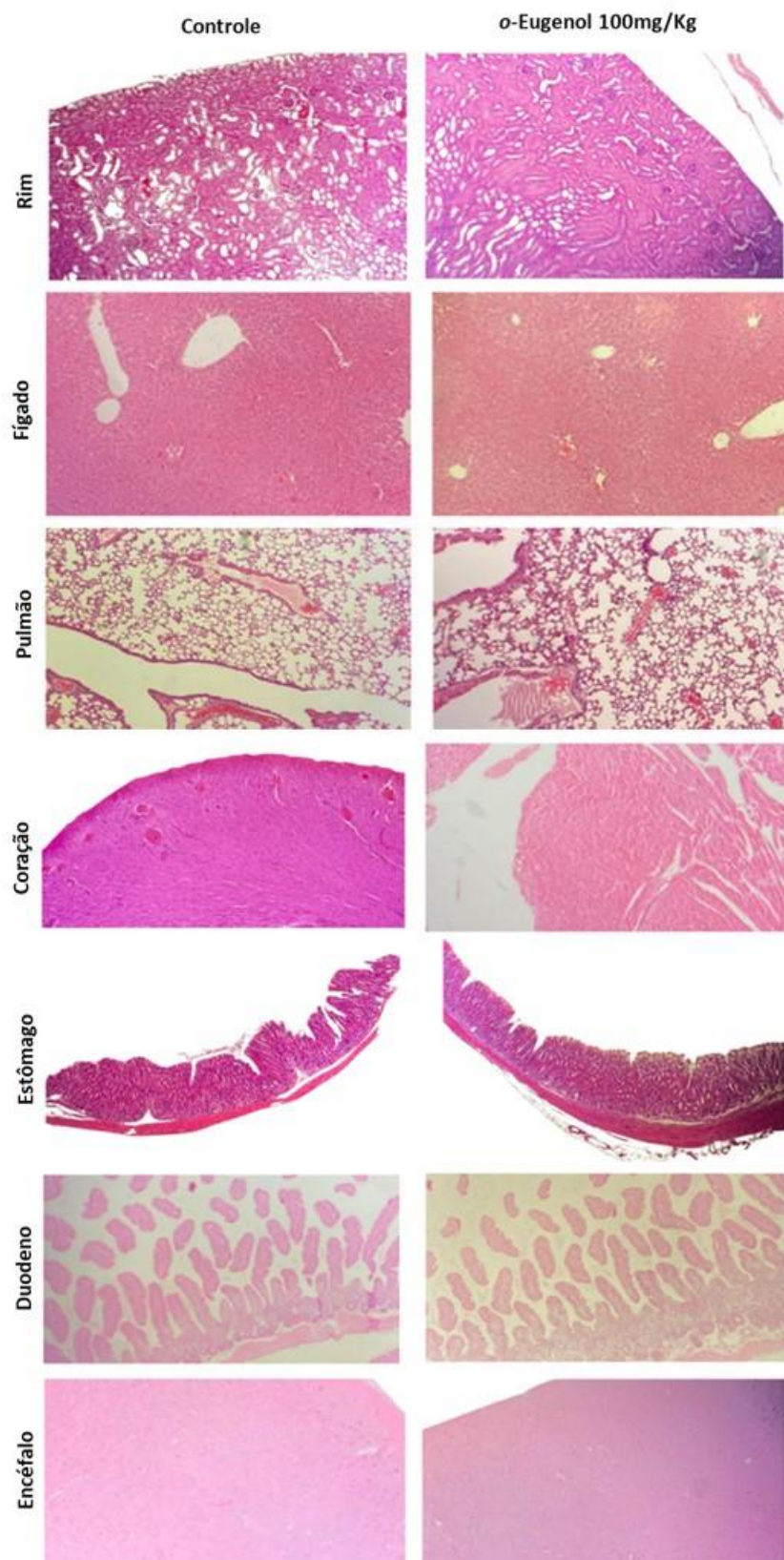
Nota: Os valores estão expressos em média ± erro padrão da média (e.p.m) (n = 6).
 Teste “t” de Student não-pareado. *p < 0,05, **p < 0,01 versus o controle.

6.3.4 Exame anatomopatológico

Na análise morfológica macroscópica não houve alteração em nenhum dos órgãos avaliados. Os órgãos do grupo pertencente ao tratamento com o *o*-eugenol também não apresentaram alterações microscópicas significativas em relação ao controle, como mudanças morfológicas, inflamatórias ou degenerativas nos tecidos examinados.

Na Figura 18 pode-se evidenciar cortes histológicos dos órgãos avaliados de cada grupo, analisados pela coloração hematoxilina-eosina em microscópio óptico, na qual não houve alterações nos parâmetros estudados.

Figura 18 – Fotomicrografias de órgãos avaliados dos grupos experimentais do estudo de toxicidade subaguda do o-eugenol.



Nota: Coloração hematoxilina-eosina. Aumento: 200X. Sem alterações histopatológicas significativas.

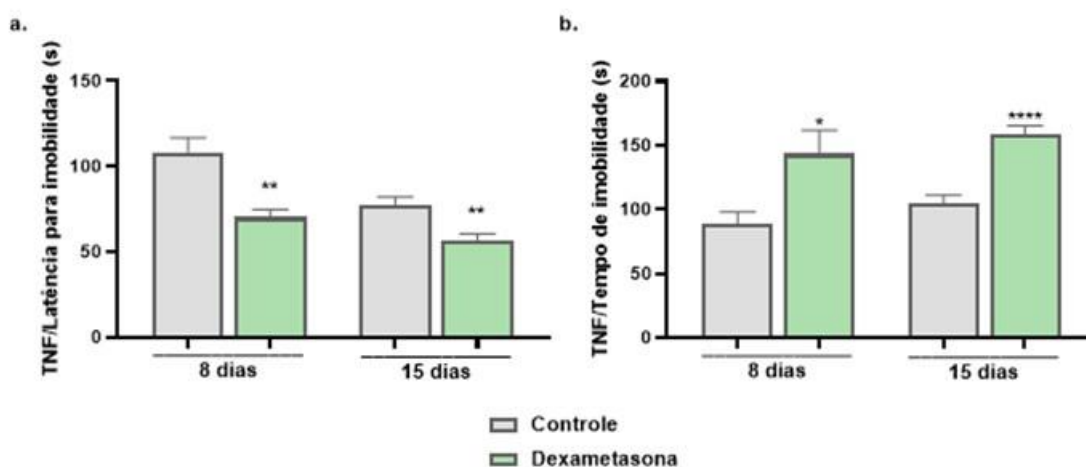
6.4 Análise farmacológica e comportamental do o-eugenol

6.4.1 Indução de depressão experimental por administração repetida de dexametasona em camundongos fêmeas

No Teste do Nado Forçado, Figura 19a, o tratamento com a dexametasona por 8 dias ($70,25 \pm 4,48$, $p = 0,0014$) diminuiu de forma significativa a latência para imobilidade dos camundongos em relação ao seu controle ($108,40 \pm 8,55$) e aumentou significativamente ($143,40 \pm 18,37$, $p = 0,0190$) o tempo de imobilidade dos camundongos em relação ao seu controle ($88,38 \pm 9,61$). Quanto ao Teste de Suspensão da Cauda, comportamento parecido foi obtido (Figura 20a). O tratamento dos camundongos com a dexametasona por 8 dias ($53,50 \pm 5,17$, $p = 0,0004$) diminuiu significativamente a latência para imobilidade em relação ao seu controle ($101,9 \pm 9,16$) e aumentou significativamente ($83,00 \pm 3,93$, $p = 0,0001$) o tempo de imobilidade dos camundongos em relação ao seu controle ($48,25 \pm 3,22$).

O tratamento com dexametasona durante 15 dias ($56,25 \pm 4,21$, $p = 0,0070$), no Teste do Nado Forçado (Figura 19b) diminuiu de forma significativa a latência para imobilidade dos camundongos em relação ao controle ($77,13 \pm 5,09$) e aumentou significativamente ($158,40 \pm 7,02$, $p < 0,0001$) o tempo de imobilidade dos camundongos em relação ao seu controle ($105,0 \pm 6,04$).

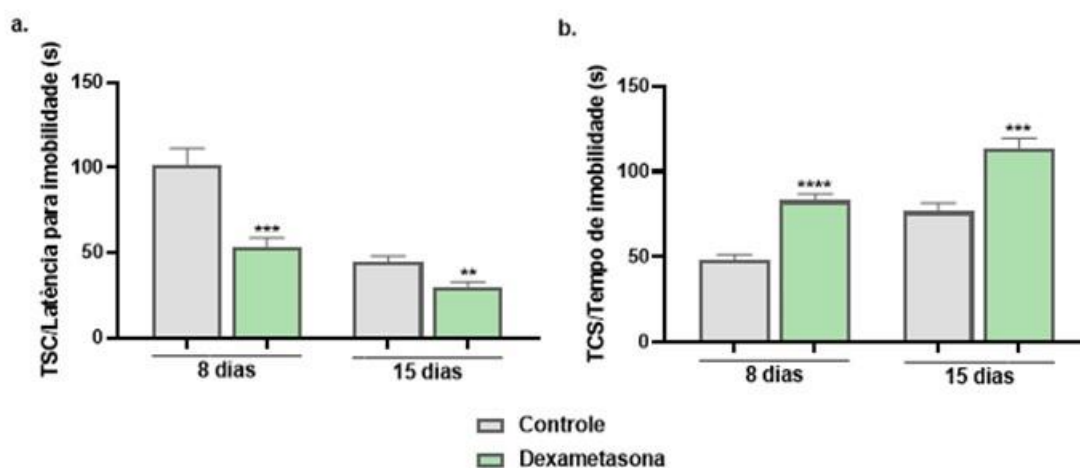
Figura 19 – Efeito da administração repetida com dexametasona ($32 \mu\text{g/kg}$, s.c.) por 8 e 15 dias na (a) latência para imobilidade e (b) tempo de imobilidade no Teste do Nado Forçado (TNF).



Nota: Cada coluna representa média $\pm$ erro padrão da média (e.p.m) ($n = 8$). Teste “t” de Student não-pareado. Valores significativos: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, **** $p < 0,0001$ versus o controle correspondente.

De forma semelhante, no Teste de Suspensão da Cauda (Figura 20b), o tratamento dos camundongos com a dexametasona por 15 dias ($30,13 \pm 2,65$, $p = 0,0070$) diminuiu significativamente a latência para imobilidade em relação ao controle ($44,38 \pm 3,66$) e aumentou significativamente ($113,8 \pm 5,79$, $p = 0,0003$) o tempo de imobilidade em relação ao seu controle ($76,63 \pm 4,99$).

Figura 20 – Efeito da administração repetida com dexametasona ($32 \mu\text{g/kg}$, s.c.) por 8 e 15 dias na (a) latência para imobilidade e (b) tempo de imobilidade no Teste da Suspensão da Cauda (TSC).

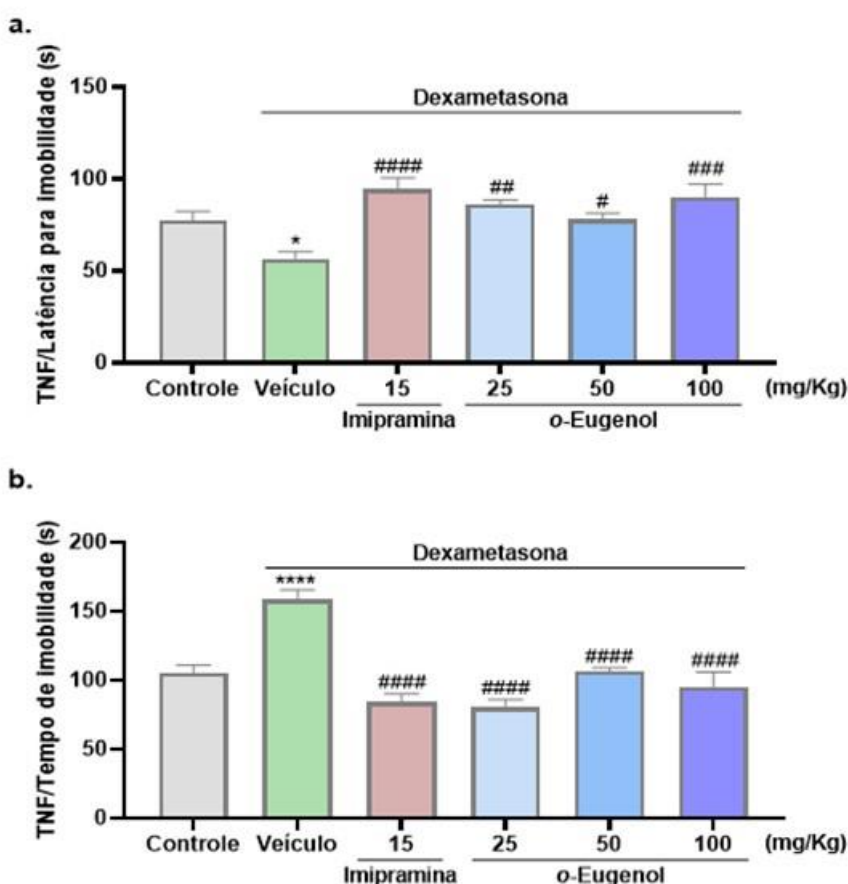


Nota: Cada coluna representa média $\pm$ erro padrão da média (e.p.m) ($n = 8$). Teste “t” de Student não-pareado. Valores significativos: ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$ versus o controle correspondente.

6.4.2 Efeito do *o*-eugenol no Teste do Nado Forçado (TNF)

Como mostrado na Figura 21a, o tratamento com a dexametasona ($56,25 \pm 4,2$, $p = 0,0488$) causou uma redução significativa do tempo de latência em relação ao grupo controle ($77,38 \pm 5,00$). O tratamento com imipramina ($94,25 \pm 6,45$, $p < 0,0001$), antidepressivo conhecido, e *o*-eugenol nas doses de 25 ($86,00 \pm 2,62$, $p = 0,0017$), 50 ($78,13 \pm 3,16$, $p = 0,0376$) e 100 ($90,25 \pm 6,92$, $p = 0,0003$) mg/kg aumentaram significativamente o tempo em relação ao grupo tratado com apenas dexametasona. Não foram observadas diferenças significativas entre as doses de *o*-eugenol, bem como entre os grupos de *o*-eugenol, a imipramina e controle.

Figura 21 – Efeito de diferentes doses de *o*-eugenol em modelo de depressão induzida por doses repetidas de dexametasona (32 µg/kg, s.c.) na (a) latência para imobilidade e (b) tempo de imobilidade no Teste do Nado Forçado (TNF).



Nota: Cada coluna representa média $\pm$ erro padrão da média (e.p.m) ($n = 8$). ANOVA one way seguido pelo Teste de Tukey. Valores significativos: * $p < 0,05$, **** $p < 0,0001$ ** versus o controle; # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$, #### $p < 0,0001$ versus ao grupo da dexametasona.

No tempo de imobilidade do Teste do Nado Forçado, mostrado na Figura 21b, a dexametasona ($158,4 \pm 7,02$, $p < 0,0001$) aumentou significativamente o tempo em relação ao grupo controle ($105,0 \pm 6,04$). Já a imipramina 15 mg/kg ($84,25 \pm 5,78$, $p < 0,0001$) e *o*-eugenol nas doses de 25 ($80,38 \pm 5,69$, $p < 0,0001$), 50 ($106,9 \pm 2,16$, $p < 0,0001$) e 100 ($95,25 \pm 10,74$, $p < 0,0001$) mg/kg reduziram significativamente o tempo de imobilidade quando comparado ao grupo tratado apenas com dexametasona. Não foram encontradas diferenças significativas entre a imipramina, o controle e as diferentes doses de *o*-eugenol.

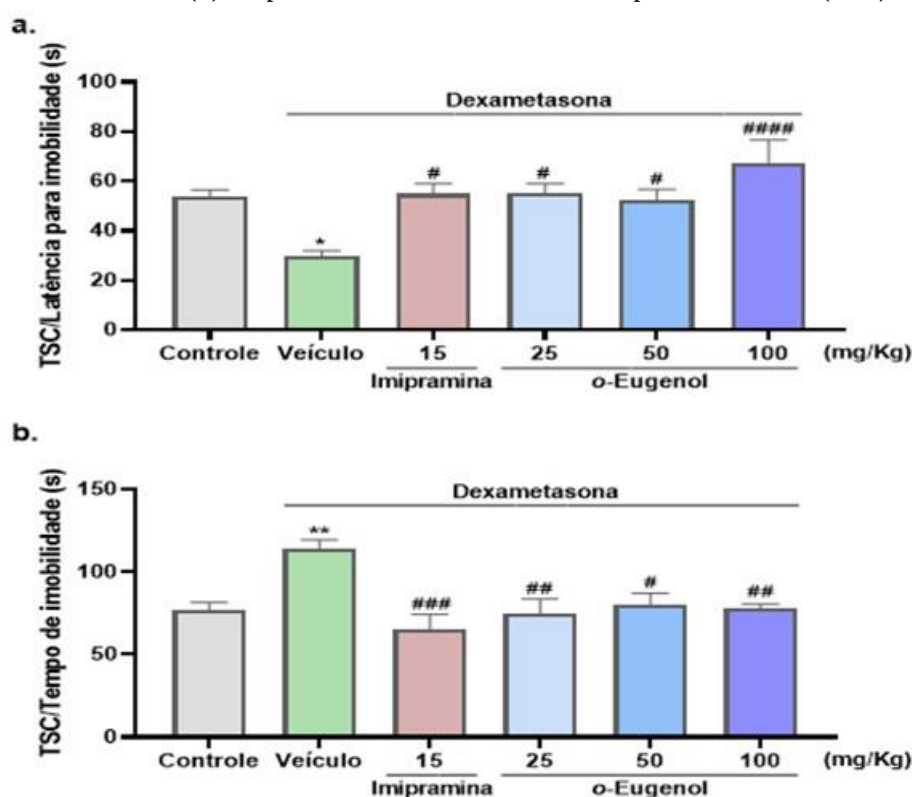
6.4.3 Efeito do *o*-eugenol no Teste de Suspensão da Cauda (TSC)

Na latência para a imobilidade no Teste de Suspensão da Cauda (Figura 22a), a dexametasona ($29,6 \pm 2,4$, $p = 0,0180$) diminuiu significativamente o tempo de latência em relação

ao grupo controle ($53,8 \pm 2,6$), enquanto que, a imipramina ($54,8 \pm 4,1$, $p = 0,0123$) e *o*-eugenol nas doses de 25 ($55,2 \pm 3,7$, $p = 0,0107$), 50 ($52,1 \pm 4,5$, $p = 0,0339$) e 100 ($67,1 \pm 9,4$, $p < 0,0001$) mg/kg aumentaram de forma significativa em comparação ao grupo tratado apenas com dexametasona. Diferenças significativas não foram observadas entre as doses de *o*-eugenol, a imipramina e o controle.

O efeito no tempo de imobilidade no Teste de Suspensão da Cauda é apresentado na Figura 22b. O tratamento com a dexametasona ($113,8 \pm 5,7$, $p = 0,0040$) causou um aumento significativo do tempo de imobilidade dos camundongos em relação ao grupo controle ($76,6 \pm 4,9$). A imipramina 15 mg/kg ($65,3 \pm 8,8$, $p = 0,0001$), e *o*-eugenol nas doses de 25 ($74,7 \pm 8,9$, $p = 0,0022$), 50 ($80,3 \pm 6,6$, $p = 0,0123$) e 100 ($77,8 \pm 2,6$, $p = 0,0059$) mg/kg diminuíram significativamente o tempo de imobilidade em comparação ao grupo da dexametasona. Não foram observadas diferenças significativas entre as diferentes doses de *o*-eugenol, a imipramina e o controle.

Figura 22 – Efeito de diferentes doses de *o*-eugenol em modelo de depressão induzida por doses repetidas de dexametasona ($32 \mu\text{g/kg}$, s.c.) na (a) latência para imobilidade e (b) tempo de imobilidade no Teste da Suspensão da Cauda (TSC).

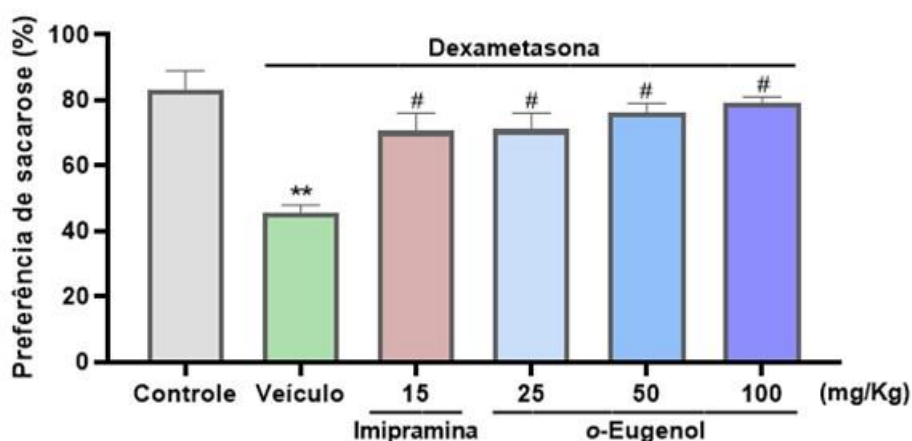


Nota: Cada coluna representa média $\pm$ erro padrão da média (e.p.m) ($n = 8$). ANOVA one way seguido pelo Teste de Tukey. Valores significativos: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ versus o controle; # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$, #### $p < 0,0001$ versus ao grupo da dexametasona.

6.4.4 Efeito do *o*-eugenol no Teste de Preferência por Sacarose (TPS)

No Teste de Preferência por Sacarose (Figura 23), a administração repetida dexametasona ($45,5 \pm 2,5$, $p = 0,0063$) diminuiu significativamente a preferência por sacarose dos camundongos em relação ao grupo controle ($83,0 \pm 6,0$), enquanto que, a imipramina ($70,5 \pm 5,5$, $p = 0,0432$) e *o*-eugenol nas doses de 25 ($71,0 \pm 5,0$, $p = 0,0396$), 50 ($76,0 \pm 3,0$, $p = 0,0175$) e 100 ($79 \pm 2,0$, $p = 0,0111$) mg/kg aumentaram de forma significativa essa preferência em comparação a dexametasona. Não foram encontradas diferenças significativas entre as doses de *o*-eugenol, como também, entre os grupos de *o*-eugenol, a imipramina e o controle.

Figura 23 – Efeito de diferentes doses de *o*-eugenol em modelo de depressão induzida por doses repetidas de dexametasona ($32 \mu\text{g/kg}$, s.c.) no Teste de Preferência por Sacarose (TPS).

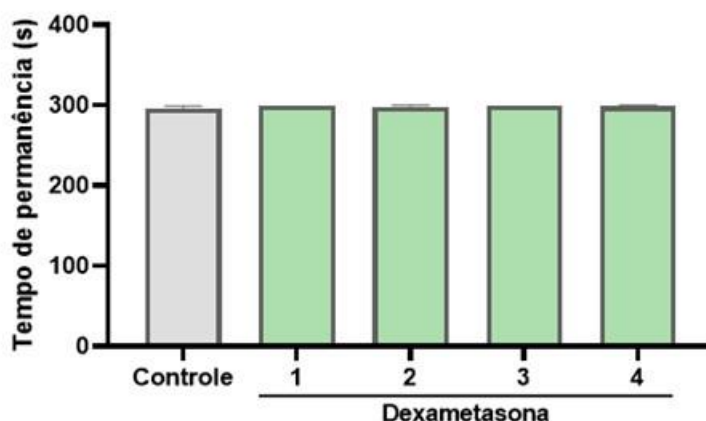


Nota: Cada coluna representa média $\pm$ erro padrão da média (e.p.m) ($n = 8$). ANOVA *one way* seguido pelo Teste de Tukey. Valores significativos: ** $p < 0,01$ versus o controle; # $p < 0,05$ versus ao grupo da dexametasona.

6.4.5 Efeito do *o*-eugenol no Teste do *Rota-rod*

Quanto a avaliação da atividade motora com a utilização do Teste *Rota-rod* aos 7 dias de tratamento com a dexametasona, não foram encontradas diferenças significativas em relação aos grupos de dexametasona ($300,00 \pm 0,00$; $297,4 \pm 2,62$; $300,00 \pm 0,00$; $298,5 \pm 1,50$) e ao controle ($296,4 \pm 2,52$) após 60 min. da administração de dexametasona (Figura 24).

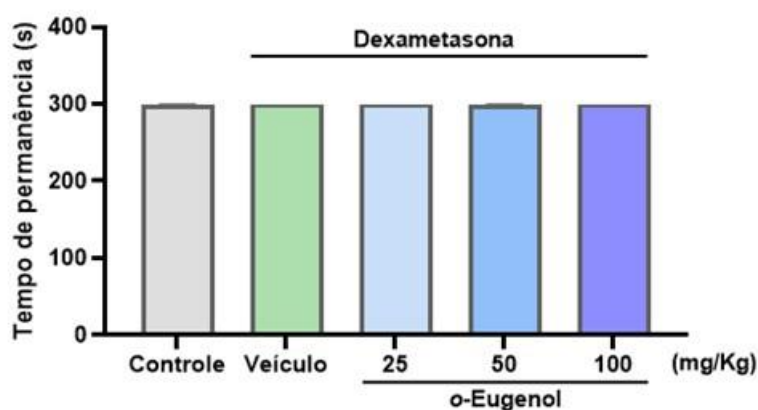
Figura 24 – Efeito da administração repetida com dexametasona (32 µg/kg, s.c.) por 7 dias, em 4 grupos, na coordenação motora pelo Teste do *Rota-rod* em 60 min. após sua administração.



Nota: Cada coluna representa média $\pm$ erro padrão da média (e.p.m) ($n = 8$). ANOVA *one way* seguido pelo Teste de Tukey. Considerado como significativo $p < 0,05$.

O tratamento com *o*-eugenol nas doses de 25 ($300,00 \pm 0,00$), 50 ($299,10 \pm 0,87$) e 100 ($300,0 \pm 0,00$) mg/kg não alterou o tempo de permanência sobre a barra giratória em 60 min. após tratamento com *o*-eugenol quando comparado ao controle ($298,80 \pm 1,25$) e ao grupo da dexametasona ($300 \pm 0,00$) (Figura 25).

Figura 25 – Efeito de diferentes doses de *o*-eugenol em modelo de depressão induzida por doses repetidas de dexametasona (32 µg/kg, s.c.) no Teste do *Rota-rod* em 60 min. após sua administração.

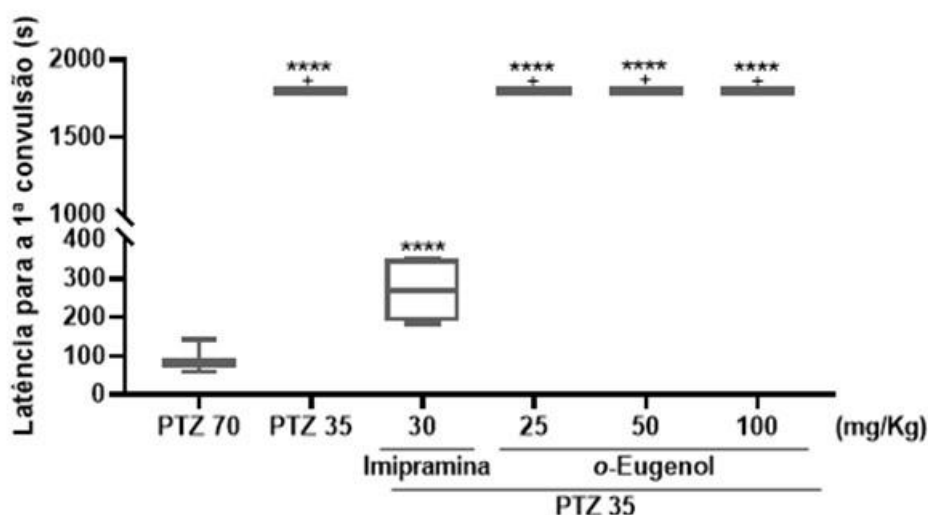


Nota: Cada coluna representa média $\pm$ erro padrão da média (e.p.m) ($n = 8$). ANOVA *one way* seguido pelo Teste de Tukey. Considerado como significativo $p < 0,05$.

6.5 Teste de limite de convulsões induzidas por pentilenotetrazol

O efeito do *o*-eugenol na latência para a primeira convulsão tônico-clônica é mostrado na Figura 26. A associação de pentilenotetrazol 35 mg/kg com as doses de *o*-eugenol 25 mg/kg, 50 mg/kg e 100 mg (1800 (1800-1800)), assim como o grupo da dose subconvulsivante de pentilenotetrazol 35 mg/kg (1800 (1800-1800)), aumentaram significativamente a latência para a primeira convulsão tônico-clônica ($p < 0,0001$) em comparação com o grupo PTZ 70 mg/kg (85,25 (58,00-143,0)), não tendo ocorrência de convulsão durante todo o período de observação. Enquanto que, a associação de pentilenotetrazol 35 mg/kg com a imipramina 30mg/kg (269,4 (182,0-353,0), $p=0,0303$), a latência para a primeira crise foi reduzida quando comparado aos grupos que não apresentaram convulsões tônico-clônicas.

Figura 26 – Efeito do *o*-eugenol em diferentes doses no teste de limite de convulsões induzidas por petilenotetrazol.



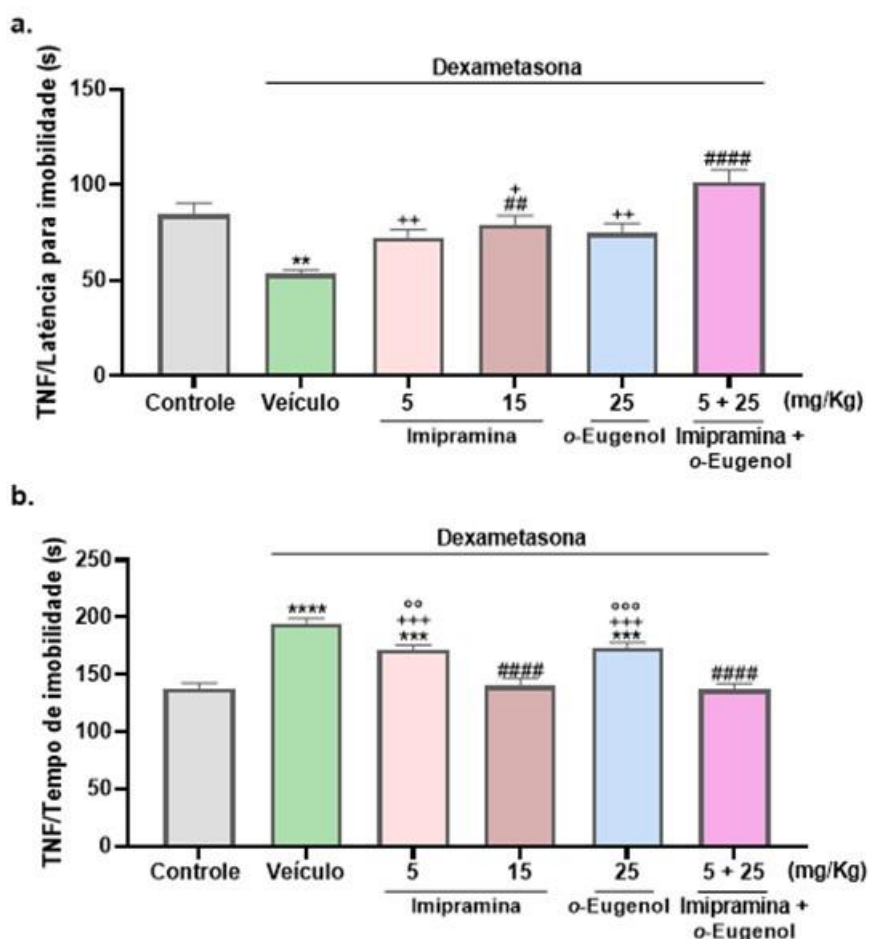
Nota: Tempo total de observação de 1.800 s. No boxplot, a linha do meio da caixa aborda a mediana, a caixa aborda o intervalo interquartil e o bigode aborda os valores máximos e mínimos ($n=8$). Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn para análise *post hoc*. Valores significativos: **** $p < 0,0001$ versus o controle; + $p < 0,05$ versus ao grupo tratado com imipramina mais PTZ (35 mg/kg). PTZ = Petilenotetrazol.

6.6 Sinergismo do *o*-eugenol com a imipramina

Na Figura 27 é visto o efeito de doses subefetivas e eficazes de imipramina e *o*-eugenol bem como a co-administração das substâncias em doses subativas na latência (Figura 27a) e tempo de imobilidade (Figura 27b) no nado forçado. A co-administração de imipramina 5 mg/kg + *o*-eugenol 25 mg/kg ($101,6 \pm 6,35$) aumentou o tempo de latência para a imobi-

lidade em relação ao tratamento isolado da dose subefetiva de imipramina 5 mg/kg ($72,50 \pm 4,23$, $p = 0,0025$) e do *o*-eugenol 25 mg/kg ($74,50 \pm 5,26$, $p = 0,0057$), como também em relação a dose efetiva de imipramina 15 mg/kg ($79,13 \pm 4,77$, $p = 0,0330$) e ao grupo tratado apenas com dexametasona ($53,38 \pm 2,17$, $p < 0,0001$). A imipramina 15 mg/kg ($79,13 \pm 4,77$, $p = 0,0099$) aumentou o tempo de latência em relação ao grupo da dexametasona ($53,38 \pm 2,17$), enquanto, a dexametasona diminuiu a latência em relação ao controle ($84,25 \pm 6,27$, $p = 0,0012$).

Figura 27 – Efeito da dexametasona (64 µg/kg, s.c.), imipramina (5 e 15 mg/kg), *o*-eugenol (25 mg/kg) e imipramina (5 mg/kg) + *o*-eugenol (25 mg/kg) na (a) latência para imobilidade e (b) tempo de imobilidade no Teste do Nado Forçado (TNF).



Nota: Cada coluna representa média $\pm$ erro padrão da média (e.p.m) ($n = 8$). ANOVA *one way* seguido pelo Teste Tukey. Valores significativos: ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$ versus o controle; ## $p < 0,01$, #### $p < 0,0001$ versus ao grupo dexametasona; + $p < 0,05$, ++ $p < 0,01$, +++ $p < 0,001$ versus ao grupo da co-administração de imipramina e *o*-eugenol; $p < 0,01$, $p < 0,001$ versus o grupo imipramina 15 mg/kg.

Quanto ao tempo de imobilidade do nado forçado, a co-administração de imipramina 5 mg/kg + *o*-eugenol 25 mg/kg ($136,5 \pm 5,48$) diminuiu o tempo em relação ao tratamento isolado da imipramina 5 mg/kg ($171,8 \pm 3,68$, $p = 0,0004$) e do *o*-eugenol 25 mg/kg ($173,0 \pm 4,99$, $p = 0,0002$), como também em relação ao grupo tratado apenas com dexametasona ($194,0 \pm 5,05$, $p < 0,0001$) e não apresentou diferença significativa em relação a imipramina 15 mg/kg e ao controle. A dexametasona ($194,0 \pm 5,05$, $p < 0,0001$) aumentou o tempo em relação ao controle ($137,4 \pm 5,29$) e em relação a imipramina 15 mg/kg ($139,9 \pm 6,83$, $p < 0,0001$). Além da diferença significativa com a co-administração de imipramina e *o*-eugenol, o grupo com a imipramina 5 mg/kg e com *o*-eugenol 25 mg/kg apresentaram aumento do tempo em relação ao controle ($p = 0,0005$, $p = 0,0003$, respectivamente) e a imipramina 15 mg/kg ($p = 0,0015$, $p = 0,0009$, respectivamente).

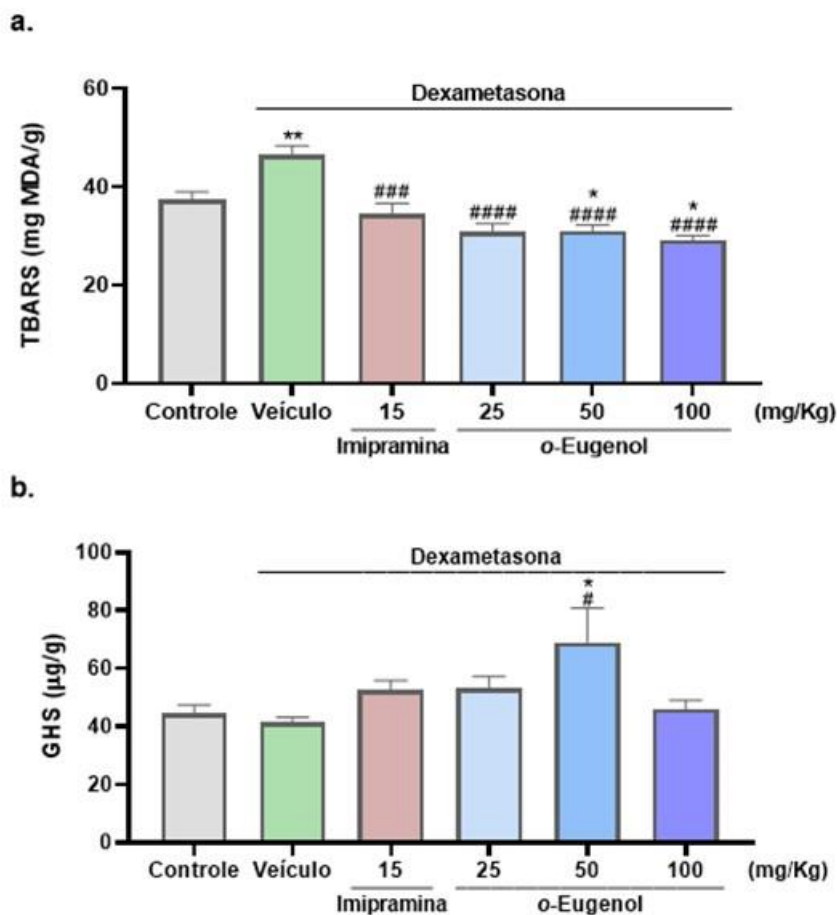
6.7 Ensaios neuroquímicos

6.7.1 Determinação de parâmetros de estresse oxidativo

Os níveis de TBARS, um índice de peroxidação lipídica, no hipocampo, expresso em mg de MDA/g, são mostrados na Figura 28a. Os resultados indicam níveis aumentados de MDA no grupo tratado apenas com a dexametasona ($46,5 \pm 1,9$, $p = 0,0042$) em relação ao grupo controle ($37,4 \pm 1,5$, $p = 0,0001$). Os grupos tratados com a imipramina 15 mg/kg ($34,5 \pm 2,1$, $p = 0,0001$), e *o*-eugenol nas doses de 25 ($30,9 \pm 1,5$, $p < 0,0001$), 50 ($31,0 \pm 1,2$, $p < 0,0001$) e 100 ($29,3 \pm 0,7$, $p < 0,0001$) mg/kg diminuíram a concentração de MDA em comparação ao grupo da dexametasona. Os grupos tratados com *o*-eugenol 50 mg/kg ($p = 0,0479$) e 100 mg/kg ($p = 0,0113$) também apresentaram diferenças significativas em relação ao controle, diminuindo a concentração de MDA.

A Figura 28b mostra os níveis de GSH, um antioxidante endógeno, no córtex pré-frontal dos camundongos. O *o*-eugenol 50 mg/kg ($69,0 \pm 11,7$), aumentou de forma significativa o nível de GSH em relação ao grupo controle ($44,4 \pm 2,9$, $p = 0,0425$) e grupo da dexametasona ($41,4 \pm 1,8$, $p = 0,0174$). Não houve diferença significativa observada entre o grupo da dexametasona e o grupo controle, como também das outras doses de *o*-eugenol e imipramina em relação ao controle e a dexametasona.

Figura 28 – Efeito de diferentes doses de *o*-eugenol nos parâmetros relacionados ao estresse oxidativo em modelo de depressão induzida por doses repetidas de dexametasona (32 µg/kg, s.c.): (a) Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS) expresso como mg de malondialdeído (MDA)/g de tecido; (b) Glutathiona Reduzida (GSH) expresso em µg/g de amostra.

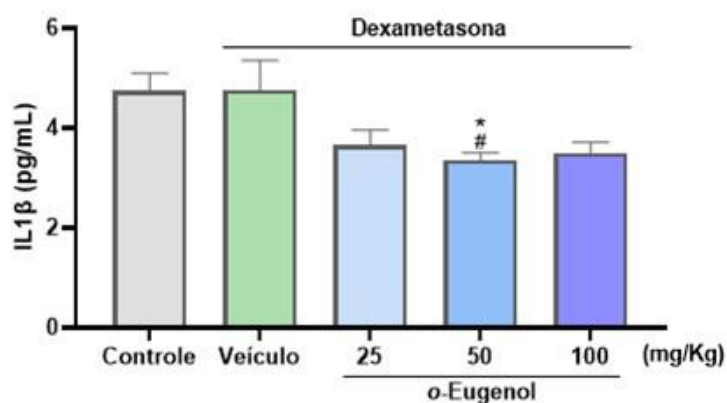


Nota: Cada coluna representa média $\pm$ erro padrão da média (e.p.m) ($n = 6-8$). ANOVA *one way* seguido pelo Teste de Tukey. Valores significativos: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ versus o controle; # $p < 0,05$; ### $p < 0,001$, #### $p < 0,0001$ versus ao grupo da dexametasona.

6.7.2 Determinação dos níveis de IL-1 β

Foram medidos os níveis de IL-1 β no soro de camundongos (Figura 29). O *o*-eugenol 50 mg/kg ($3,36 \pm 0,15$), diminuiu de forma significativa o nível de IL-1 β em relação ao grupo controle ($4,75 \pm 0,35$, $p = 0,0347$) e grupo da dexametasona ($4,76 \pm 0,58$, $p = 0,0326$). Não houve diferença significativa observada entre o grupo da dexametasona e o grupo controle, como também das doses de 25 mg/kg ($3,66 \pm 0,30$) e 100 mg/kg ($3,50 \pm 0,21$) de *o*-eugenol em relação ao controle e a dexametasona.

Figura 29 – Efeito de diferentes doses de *o*-eugenol na concentração de IL-1 β no soro de camundongos em modelo de depressão induzida por doses repetidas de dexametasona (32 μ g/kg, s.c.).

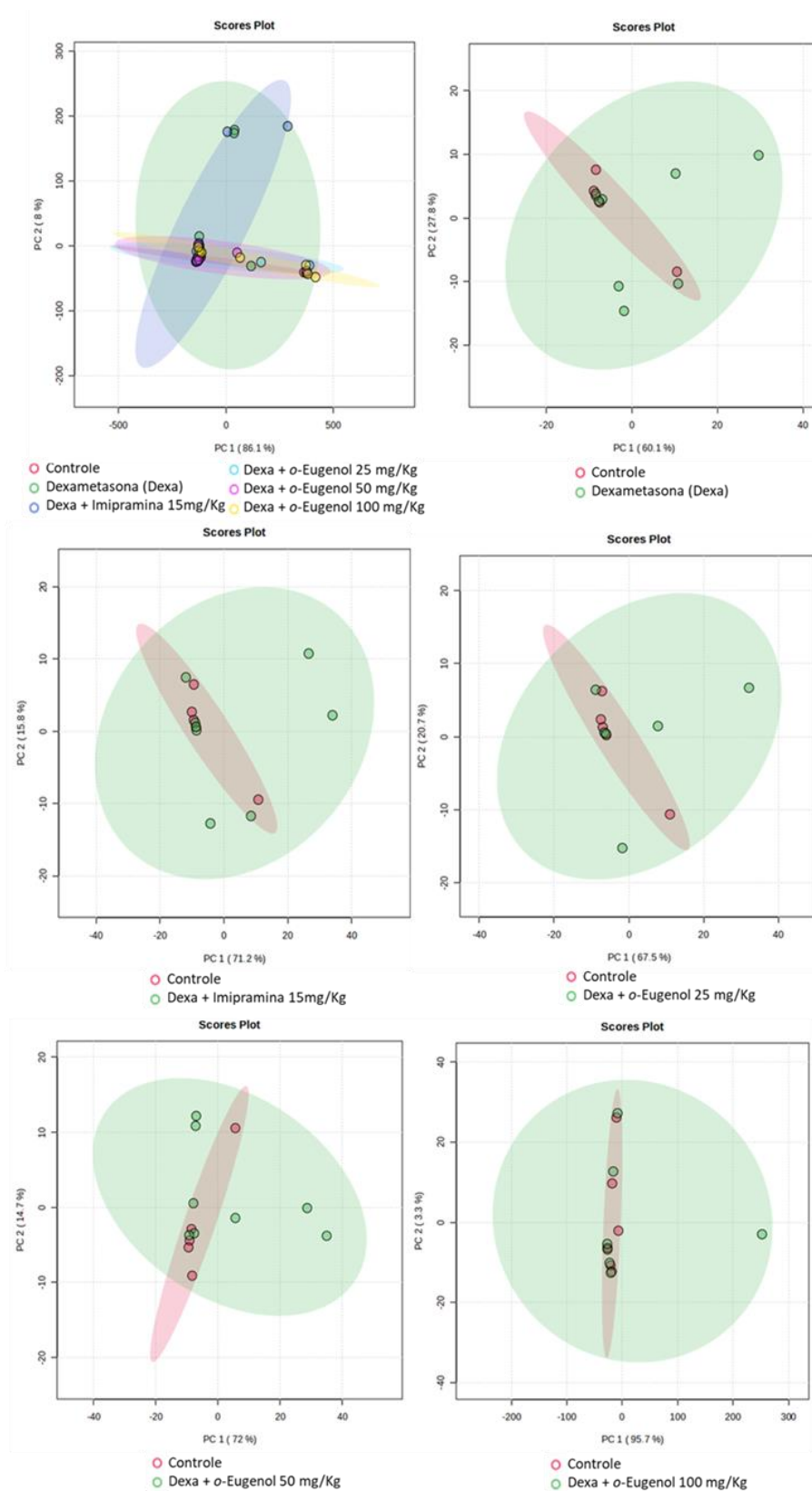


Nota: Cada coluna representa média $\pm$ erro padrão da média (e.p.m) (n = 6-7). ANOVA *one way* seguido pelo Teste de Tukey. Valores significativos: *p < 0,05 *versus* o controle; #p < 0,05 *versus* ao grupo da dexametasona.

6.7.3 Metabolômica por ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H

O PCA foi utilizado para analisar as diferenças nos perfis químicos no hipocampo dos grupos de animais. De acordo com Figura 30 não houve diferenças importantes entre os grupos pela análise do PCA. Os gráficos de pontuação do PCA não mostraram tendência de separação entre os grupos.

Figura 30 – Gráficos de pontuação de PCA obtidos dos dados de espectros de RMN de ^1H das amostras de hipocampo de camundongos que tiveram administração em doses repetidas de dexametasona ($32\mu\text{g/kg}$) e/ou tratamento com imipramina e doses diferentes de *o*-eugenol.



7 DISCUSSÃO

Estudos com constituintes de óleos essenciais vêm sendo realizados por apresentarem propriedades psicofarmacológicas. Os fenilpropanóides, metabólitos secundários das plantas, são constituintes importantes dos óleos essenciais. Dentre eles, o eugenol e análogos exibiram atividade antidepressiva (Do Amaral et al., 2013; Irie et al., 2004; Tao et al., 2005). Neste estudo, foram investigadas as propriedades toxicológicas do fenilpropanóide *o*-eugenol por meio de simulações computacionais do estudo *in silico* e de estudo *in vivo* por meio da toxicidade aguda e em doses repetidas, além de avaliar a atividade antidepressiva e mecanismos de ação do *o*-eugenol *in vivo*.

A avaliação dos processos farmacocinéticos, que incluem absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade (ADMET), representa um desafio significativo no desenvolvimento de novos fármacos, sejam eles de origem natural ou sintética. Esses processos desempenham um papel crucial na determinação da quantidade de um composto que alcança a biofase para exercer seu efeito farmacológico desejado. Desse modo, avanços tecnológicos têm permitido abordagens mais proativas na identificação de potenciais falhas nesse processo. Exemplo disso, têm-se plataformas virtuais como pkCSM e SwissADME, que utilizam modelos preditivos *in silico*, cujos modelos matemáticos tem se tornado útil na identificação precoce de problemas de ADMET durante a fase pré-clínica (Honório et al., 2013).

A observação de que o *o*-eugenol atende aos critérios da regra de Lipinski (Tabela 1) sugere que esta molécula pode ser prontamente absorvida pelo organismo quando administrado por via oral, o que é uma vantagem significativa no desenvolvimento um novo agente farmacológico (Bitew et al., 2021).

As células Caco-2, que são células imortalizadas derivadas de adenocarcinoma colorretal do epitélio humano, são comumente utilizadas na previsão da absorção oral de substâncias. Nesse modelo de previsão, o *o*-eugenol demonstrou valores acima do limiar, indicando uma permeação considerável das substâncias através dessas células. Quanto à absorção gastrointestinal, que é o principal local de absorção de fármacos, o fenilpropanóide mostrou uma boa taxa de absorção (94%). Em relação à permeabilidade, o composto apresentou um potencial para administração transdérmica (Pires et al., 2015). No que diz respeito ao modelo de previsão baseado no ovo cozido, ou "*boiled-eggs*", demonstrou uma absorção intestinal satisfatória, além de atingir o SNC pela capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica. Somado a tais condições, não demonstra ser potencial substratos de glicoproteínas, cujo mecanismo de e fluxo, demonstra ser limitante na biodisponibilidade central (Chai et al., 2022).

Com relação ao parâmetro de distribuição, *o*-eugenol demonstra um considerável volume de distribuição e uma significativa capacidade de permeação no cérebro. Essas observações sugerem a possibilidade de sua atuação no sistema nervoso central (Silva et al., 2020).

O sistema do citocromo P450 é uma família de enzimas responsável pelo metabolismo de uma ampla variedade de compostos endógenos e exógenos, incluindo fármacos, toxinas e componentes dietéticos. Entre as várias isoformas do citocromo P450, as isoformas CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 e CYP3A4 são particularmente importantes no metabolismo de muitos fármacos. O *o*-eugenol não é um substrato para nenhuma das isoformas estudadas, exceto para CYP1A2, onde atua como um inibidor enzimático. Os inibidores da isoforma CYP1A2 podem representar alguns riscos de interações medicamentosas devido ao metabolismo reduzido de outros fármacos que são substratos desta enzima (Hakkola et al., 2020).

Os modelos preditivos *in silico* desempenham um papel vital na avaliação antecipada de potenciais respostas tóxicas de substâncias químicas, sendo amplamente utilizados em testes de toxicidade, como os testes de AMEs, para prever a mutagenicidade de compostos. Além disso, esses modelos são essenciais na previsão da inibição do canal hERG, um importante marcador de risco de arritmias cardíacas graves, assim como na identificação de outros tipos de toxicidade, incluindo hepatotoxicidade e sensibilização da pele. Ao empregar algoritmos computacionais e bancos de dados de informações toxicológicas, esses modelos oferecem uma maneira eficiente e econômica de triar grandes números de compostos quanto ao seu potencial de risco, contribuindo para o desenvolvimento de medicamentos mais seguros e produtos químicos industriais (Maia et al., 2023).

Os resultados obtidos demonstram a ausência de toxicidade no modelo AME, e a falta de inibição nos canais hERG, os quais desempenham um papel essencial nas funções eletrofisiológicas associadas a alterações cardíacas. Apesar de não haver possível toxicidade sistêmica, o composto mostrou-se preditivamente como potencial sensibilizante da pele, o que sugere a necessidade da avaliação adicional de sua segurança e potencial de toxicidade dérmica. Portanto, no geral, esses achados sugerem uma boa segurança e tolerabilidade do composto em avaliação, indicando um potencial promissor para desenvolvimentos futuros (Pires et al., 2015).

Dando continuidade, no estudo da toxicidade aguda *in vivo*, *o*-eugenol mostrou ter baixa toxicidade por via oral evidenciada pela estimativa da sua DL_{50} de 1.000 mg/kg, em camundongos, que se enquadrou na Categoria 4 do Sistema de Classificação Globalmente Harmonizado (GHS), o que sugere uso com cautela. Pela via intraperitoneal, em camundongos, o *o*-eugenol demonstrou possuir DL_{50} de 307,5 mg/kg (Fonsêca, 2016). Essa diferença

entre as duas vias de administração, provavelmente seja pelo fato de que a administração da substância por via oral tem biodisponibilidade diferente da administrada por via intraperitoneal, devido ao intenso metabolismo de primeira passagem no fígado, além da diferença de outros fatores como pH, superfície de absorção e irrigação sanguínea (Al Shoyaib et al., 2019). Dados toxicológicos indicam que o eugenol apresenta DL₅₀ aguda, por via oral, entre 1.500 e 3.000 mg/kg de peso corporal para camundongos (ECHA, 2021). O metil-eugenol, outro análogo do eugenol, foi relatado como tendo uma toxicidade aguda relativamente baixa por via oral, com uma DL₅₀ aguda em ratos de cerca de 1.000 mg/kg (Beroza et al., 1975). Utilizando também as diretrizes da OECD, o *trans*-anetol, um fenilpropanóide, teve uma DL₅₀ aguda, por via intraperitoneal, estimada de 1.000 mg/kg em camundongos (Da Guedes et al., 2022).

A toxicidade de uma substância está relacionada com a sua capacidade de causar dano grave ou até a morte de um organismo. Toda substância pode ser um agente tóxico, dependendo de variáveis de uso tais como dose, via de administração (oral, respiratória, dérmica, parenteral) e frequência de exposição (dose única ou doses repetidas) (Castro, 1993). Com a dose 2.000 mg/kg do *o*-eugenol, houve morte de animais e presença de sinais tóxicos com alta intensidade. Porém, o animal sobrevivente apresentou redução de peso, baixo consumo de água e ração nos primeiros dias, mas teve seu quadro geral recuperado no decorrer dos 14 dias, o que indica reversibilidade do quadro clínico.

A triagem farmacológica comportamental utilizada possui uma metodologia simples que possibilita a detecção de efeito central de droga, usando como parâmetros o aparecimento de sinais ou alteração no comportamento dos animais (Almeida & Oliveira, 2006). Neste estudo, os animais tratados com *o*-eugenol na dose de 300 mg/kg apresentaram, de forma discreta, comportamentos indicativos de efeito depressor no SNC, como ambulação e resposta ao toque diminuídas, analgesia, perda do reflexo auricular, perda do reflexo corneal e ptose palpebral, porém esses efeitos perduraram por pouco tempo. Na dose de 2.000 mg/kg, esses efeitos foram mais intensos e acrescentados por outros comportamentos. No trabalho de Fonsêca (2016), animais tratados com *o*-eugenol nas doses de 100, 200, 225, 250, 300 e 400 mg/kg por via intraperitoneal, também foi encontrado comportamentos sugestivos de efeito depressor central, como ambulação e resposta ao toque diminuídas, analgesia, perda do reflexo auricular e corneal. Assim, com o indicativo de atividade no SNC, investigamos a atividade antidepressiva do *o*-eugenol em doses menores das utilizadas na triagem comportamental.

Para avaliar a toxicidade sistêmica aguda do *o*-eugenol, foi medido o consumo de água e ração, verificado a ocorrência de alterações do peso corporal e comportamentais, além de análise macroscópica e microscópica de órgãos dos animais.

O consumo de água e ração são parâmetros importantes no estudo da segurança da droga, sendo essenciais ao funcionamento do organismo. Esses parâmetros contribuem no estudo da segurança de produtos por serem essenciais para um bom funcionamento do sistema fisiológico dos animais e para uma resposta adequada à droga testada por condições nutricionais impróprias poderem acarretar deficiência do organismo (Stevens & Mylecraine, 1994). Neste estudo, com a utilização da dose de *o*-eugenol 300mg/kg de forma aguda, não houve diferença significativa no consumo de água e ração em relação ao controle.

Segundo Pires Júnior et al. (2012), a variação de peso é um dos parâmetros mais utilizados em avaliações toxicológicas para indicar o aparecimento, muitas vezes precoce, de efeitos tóxicos de uma determinada substância no organismo animal. No estudo aqui apresentado, o ganho de peso dos camundongos tratados com *o*-eugenol 300 mg/kg após 7 e 14 dias do início do ensaio de toxicidade aguda não foram significativamente diferentes em relação ao controle, sugerindo baixa toxicidade do *o*-eugenol nesta dose e neste parâmetro.

Nosso estudo está de acordo com o ensaio toxicológico não clínico agudo feito com ferulato de etila, um composto fenólico da classe dos fenilpropanóides, utilizando metodologia semelhante, os animais tratados na dose 300 mg/kg apresentaram alterações comportamentais como sedação, catatonia, analgesia e diminuição da ambulação. Porém, o consumo de ração foi maior no grupo de 2.000 mg/kg, mas sem diferença significativa na variação de peso. Os parâmetros bioquímicos não apresentaram diferenças entre os animais tratados e controle, e os órgãos permaneceram intactos, sem alterações (Bomfim et al., 2022).

Quanto a análise macroscópica e microscópica dos órgãos, não foram observadas alterações no fígado, rins, pulmão, estômago e intestino delgado, órgãos importantes no metabolismo e excreção de xenobióticos, além de coração e encéfalo dos animais tratados com o *o*-eugenol. Vale ressaltar, que mesmo os órgãos não tendo alterações macroscópicas após a autopsia dos animais, todos passaram pelo exame histopatológico e não apresentaram alterações em sua microscopia, não sendo evidenciada nenhuma lesão de caráter degenerativo, inflamação ou necrose, indicando a preservação da integridade histológica em resposta aos tratamentos administrados.

Como a maior dose de *o*-eugenol foi sugestiva de efeito antidepressivo no modelo de depressão animal por administração de doses repetidas de dexametasona, foi realizado o ensaio toxicológico de doses repetidas de 28 dias. Um estudo de doses repetidas fornece a caracterização do perfil toxicológico da substância pela administração repetida (ANVISA, 2013). No presente estudo, *o*-eugenol na dose de 100 mg/kg foi administrado diariamente por 28 dias e não foram observados sinais clínicos anormais, efeitos tóxicos ou morte. Também não foram encontradas alterações significativas no consumo de água e ração, nem referente ao peso

dos animais em relação ao grupo controle. Além disso, nenhum órgão apresentou alterações macroscópicas após a autopsia dos animais e, no exame histopatológico de 50% do grupo, nenhum deles apresentou alterações significativas comparadas ao controle em sua microscopia. O que sugere uma segurança em relação do tratamento em relação a esses parâmetros avaliados.

Na sequência, foram realizados os testes do *rota-rod* e campo aberto. O teste do *rota-rod* avalia o efeito do relaxamento muscular ou incoordenação motora produzidos por drogas nos animais (Carlini, 1979). Porém, se trata de um método não específico, uma vez que mede indistintamente, efeitos neurológicos, estimulantes e depressores sobre a coordenação motora, o qual é atribuído o termo neurotoxicidade (Dunham & Miya, 1957; Almeida & Oliveira, 2006). Este teste vem sendo empregado em fases precoces nos estudos experimentais não-clínicos de fármacos com o objetivo de identificar efeitos adversos motores e sistêmicos que apenas tardiamente poderiam ser vistos (Pinto & Ko, 2012). Neste teste, o *o*-eugenol não promoveu alterações na coordenação motora dos animais, o que sugere que a substância não apresentou sinais de neurotoxicidade ou relaxamento muscular.

O teste de campo aberto fornece indícios do estado emocional dos roedores, baseando na tendência natural que o animal possui, em um ambiente novo, de ter um comportamento exploratório, apesar do estresse e do conflito provocado pelo mesmo. É um procedimento utilizado para medir não apenas comportamentos semelhantes à ansiedade, mas também alteração na atividade locomotora ou mesmo sedação (Prut & Belzung, 2003). Nos parâmetros analisados do campo aberto, o *o*-eugenol não alterou a atividade locomotora e exploratória dos animais, o que é indicativo de não possuir efeito sedativo ou estimulante.

Além disso, foi realizado o hemograma dos animais tratados com *o*-eugenol 100 mg/kg durante os 28 dias. O hemograma é um exame em que é agrupado uma série de parâmetros que avaliam a integridade quantitativa e qualitativa dos elementos celulares presentes no sangue: os eritrócitos, leucócitos e plaquetas (Maya, 2013).

Faz parte da avaliação eritrocitária (eritrograma) o número absoluto de eritrócitos, dosagem de hemoglobina (Hb), hematócrito (Ht), volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) (De Oliveira et al., 2022). A contagem de eritrócitos corresponde ao número de eritrócitos presentes no sangue periférico por unidade de volume sanguíneo. O hematócrito é a proporção do volume de sangue que é ocupado por eritrócitos, sendo importante na avaliação da série vermelha, devido à boa reprodutibilidade e à precisão (Maya, 2013). A redução da taxa de hemoglobina, proteína especializada no transporte de oxigênio presente nos eritrócitos,

correlacionada aos índices hematimétricos no hemograma é um fator determinante para o auxílio no diagnóstico de diferentes tipos de anemias (De Oliveira et al., 2022; Maya, 2013). O VCM analisa a média do tamanho das hemácias. Os índices hematimétricos HCM e CHCM avaliam as concentrações de Hb intracelulares (Maya, 2013). Com relação a esses parâmetros, no nosso estudo não foram observadas alterações de importância clínica nesses parâmetros hematológicos avaliados. A diminuição da HCM do grupo tratado com *o*-eugenol em relação ao controle não sugere sinais de toxicidade devido aos valores estarem dentro dos parâmetros de normalidade para camundongos, 13,7 a 18,1 (Jain, 1993), podendo ser atribuída a uma variação normal, e também não houveram alterações nos demais itens da avaliação eritrocitária.

O leucograma é composto pela contagem total de leucócitos e a contagem diferencial de leucócitos, quantificação das subpopulações leucócitos, no sangue periférico. Os leucócitos são células de defesa do organismo e a alteração do leucograma pode ser presente em uma variedade de situações clínicas. Enquanto a contagem de plaquetas corresponde ao número de plaquetas no sangue periférico e está envolvida no processo de coagulação do sangue (Maya, 2013). No nosso estudo, não foi observado alterações significativas do grupo do *o*-eugenol em relação ao controle nos itens do leucograma e contagem de plaquetas, sugerindo a ausência de toxicidade dessa substância nesses parâmetros analisados.

Quanto aos parâmetros bioquímicos avaliados, na maioria não foi observado alterações significativas no grupo tratado com *o*-eugenol durante 28 dias consecutivos em relação ao grupo controle. Um dos órgãos mais importante do corpo é o fígado, o qual é responsável pelo metabolismo e desintoxicação da maioria dos xenobióticos que entram no corpo. Elevadas quantidades de transaminases (ALT e AST) são liberadas na circulação sanguínea em caso de lesões aos hepatócitos, sendo consideradas importantes marcadores para avaliação de danos hepáticos (Kobayashi et al., 2020). A fosfatase alcalina (ALP) tem procedência de vários tecidos, mas principalmente está relacionada ao sistema ósseo e hepático, sendo no hepático mais utilizada para investigação de toxicidade relacionada ao sistema hepatobiliar, como obstrução biliar (Kasarala & Tillmann, 2016). A concentração de as proteínas e albumina no soro pode ser usada para determinar diferentes tipos de danos hepáticos. A albumina é a principal proteína circulante, sendo o fígado, local exclusivo de sua síntese (Yakubu et al., 2003). Entre os parâmetros que se relaciona com a função hepática, foi visto apenas uma diminuição significativa de ALT do grupo tratado com *o*-eugenol 100 mg/kg, sugerindo que a substância não tem efeitos tóxicos no fígado nesta dose.

O rim é um órgão excretor fundamental para o funcionamento normal do organismo. A ureia, creatinina e ácido úrico são metabólitos nitrogenados de origem não proteica depura-

dos após a filtração glomerular, através do sistema renal, enquanto nos túbulos, eletrólitos (como Na^+ e K^+) são reabsorvidos na manutenção da homeostase do corpo. A avaliação destes metabólitos e eletrólitos contribui para mensurar a capacidade funcional do rim (Yakubu et al., 2003; Nwankpa et al., 2018). Os níveis séricos dos metabólitos nitrogenados de origem não proteica (uréia, creatinina e ácido úrico) e eletrólitos (Na^+ e K^+) do grupo tratado com o *o*-eugenol 100 mg/kg não diferiram de forma significativa do grupo controle. Os resultados, neste estudo, referente a estes parâmetros, sugerem que o *o*-eugenol nesta dose não interfere na função renal. Níveis anormais de ácido úrico e dos eletrólitos no organismo também podem ser associados a diferentes doenças.

O aumento dos níveis séricos de colesterol total e dos triglicerídeos é um fator de risco para doenças cardiovasculares (Hedayatnia et al., 2020). Em relação aos níveis séricos de triglicerídeos, foi observado um aumento significativo do grupo tratado com *o*-eugenol 100 mg/kg, enquanto que nos níveis de colesterol não houve diferença significativa, ambos comparados ao controle. O aumento sérico dos triglicerídeos precisa ser melhor investigado, pois o valor não está muito elevado em relação ao controle e um intervalo de referência dos valores normais para triglicerídeos em camundongos não foi encontrado na literatura, existindo a possibilidade do valor encontrado no estudo está dentro desse intervalo e ser uma variação normal dentro da espécie.

Com o objetivo de avaliar a integridade dos órgãos em resposta ao tratamento, foi realizada o exame anatomopatológico, realizando a análise macroscópica e feita a microscópica mesmo que os órgãos não tenham alterações macroscópicas após a autopsia dos animais. No nosso trabalho, na análise macroscópica e microscópica dos órgãos, não foram observadas alterações morfológicas, inflamatórias ou degenerativas nos tecidos examinados do fígado, rins, pulmão, estômago e intestino delgado, que são órgãos importantes no metabolismo e excreção das drogas. Além disso, também não foram observadas alterações no coração e encéfalo, órgãos essenciais do organismo. Isso indica que o tratamento não afetou a integridade desses órgãos.

Logo, podemos afirmar que, além do consumo de água e ração, peso corporal e coordenação motora, a utilização da dose 100 mg/kg por 28 dias não apresentou alterações significativas de toxicidade em camundongos nos parâmetros hematológicos, bioquímicos e no estudo macroscópico e microscópico quando comparado com animais controle normais.

Concluída a análise toxicológica, demos sequência com a indução do comportamento do tipo depressivo, administrando dexametasona em camundongos fêmeas. A dexametasona é

um agonista sintético dos receptores de glicocorticóides e, como outros corticosteróides, possui propriedades imunossupressoras e anti-inflamatórias (Andreacos et al., 2021). Embora seja utilizada principalmente no tratamento de alergias, asma e processos inflamatórios, ela é estudada em modelos animais de depressão, a qual causa alterações comportamentais similares a depressão nos animais.

Os glicocorticoides, como o cortisol encontrado em humanos e a corticosterona em roedores, são secretados pela glândula adrenal em resposta à ativação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA). Esses hormônios glicocorticoides geralmente regulam o eixo HPA através da inibição por *feedback* negativo, mediada por dois subtipos distintos de receptores intracelulares referidos como receptor de mineralocorticóide (RM) e receptor de glicocorticóide (RG). Porém, acredita-se que o RG seja mais importante na regulação da resposta ao estresse quando os níveis endógenos de glicocorticóides são elevados (Alheira & Brasil, 2005; Mesripour et al., 2019; Pariante et al., 2001).

Alterações no eixo HPA levando a hipercortisolemia parecem estar associadas a distúrbios do humor, sobretudo depressão (Alheira & Brasil, 2005). Pacientes com depressão maior exibem *feedback* negativo do eixo HPA prejudicado, com níveis circulantes elevados de cortisol, possivelmente causado por função alterada do RG que promove a hiperatividade do eixo HPA na depressão (Anacker et al., 2011; Dabbah-Assadi et al., 2022; Pariante et al., 2001). É visto que RGs têm papel importante na hiperatividade do eixo HPA, plasticidade cerebral e no humor (Mesripour et al., 2019; Pariante et al., 2001).

Várias evidências sublinham a relação entre níveis elevados de glicocorticóides no sangue e transtorno depressivo, seja em doentes sob terapêutica com corticosteróides ou em estudos com animais (Lim et al., 2018; Mesripour et al., 2019; Nikkheslat et al., 2020; Wu et al., 2021). É de conhecimento que o cortisol regula a neurogênese, a sobrevivência neuronal e a aquisição da memória, mas que em altos níveis desse hormônio podem se relacionar à manifestação de sintomas depressivos por levar a alterações estruturais e funcionais cerebrais (Dabbah-Assadi et al., 2022; Mesripour et al., 2019), especialmente no hipocampo, onde resulta em neurogênese reduzida e neuroplasticidade prejudicada (Anacker et al., 2011).

A resposta alterada do eixo HPA também foi caracterizada com o uso da dexametasona. O mecanismo de ação da dexametasona em modelos animais de depressão não é totalmente compreendido, mas acredita-se no seu envolvimento na modulação do eixo HPA, podendo levar a alterações nesse eixo intrincadas na resposta do organismo ao estresse (Anacker et al., 2011; Dabbah-Assadi et al., 2022; Pariante et al., 2001). Sabe-se que os corticosteroides sintéticos, como a dexametaxona, se ligam com alta afinidade aos GRs, mas não aos MRs

(Dabbah-Assadi et al., 2022) e que causam alterações comportamentais similares à depressão, aumentando os níveis de cortisol devido à hiperestimulação do eixo HPA, o que provoca efeitos neurais excitotóxicos observados em pacientes com transtorno depressivo (Anacker et al., 2011; Dabbah-Assadi et al., 2022; Martino, 2014; Pariante et al., 2001).

Em estudos realizados, utilizando a administração de glicocorticoide como a dexametasona, roedores apresentaram alterações comportamentais associadas à depressão, como a diminuição da preferência por sacarose, aumento do tempo de imobilidade no teste de nado forçado (TNF) (Laaziz et al., 2022; Mesripour & Rakhshankhah, 2021; Skupio et al., 2015) e no teste de suspensão da cauda (TSC) (Araújo, 2018; De Souza et al., 2019; Lim et al., 2018), alterações bioquímicas na concentração de receptores e neurotransmissores (Lim et al., 2018; Skupio et al., 2015; Xu et al., 2019) e morfológicas (Conti et al., 2017; Głombik et al., 2023, Ruksee et al., 2014). É relatado que o tratamento crônico com dexametaxona aumenta a neurodegeneração no córtex e no hipocampo em camundongos (Hu et al., 2016). Vários estudos também indicaram que a administração de corticosterona provoca comportamentos semelhantes aos citados associados à depressão (Badr et al., 2020; Parente et al., 2018; Zhao et al., 2020).

Quanto ao modo de administração, é relatado que a dexametasona pode produzir comportamento do tipo depressivo em animais tanto na administração aguda (De Souza et al., 2019; Mesripour & Rakhshankhah, 2021; Wróbel et al., 2014) como de uso prolongado (Mesripour & Rakhshankhah, 2021; Wróbel et al., 2014; Skupio et al., 2015; Wu et al., 2021). No presente trabalho, mimetizamos o comportamento tipo depressivo por meio de doses repetidas de dexametasona durante 15 dias e no estudo do sinergismo do *o*-eugenol com a imipramina foi utilizado a administração aguda.

No 8º dia de administração da dexametasona, dia anterior ao início de administração de diferentes tratamentos, os animais correspondentes ao grupo controle e ao grupo programado a receber apenas a dexametasona durante os 15 dias foram submetidos aos testes de suspensão da cauda (TSC) e do nado forçado (TNF), para assegurar que o comportamento depressivo fosse identificado previamente, antes do início dos tratamentos. Isso também permitiu comparar o comportamento depressivo induzido pela dexametasona no grupo tratado apenas com o glicocorticoide, tanto no meio quanto no final do experimento.

Os testes comportamentais são importantes para a pesquisa de descoberta de novos medicamentos (Belovicova et al., 2017). O TSC e o TNF estão entre os experimentos comportamentais mais utilizados para a avaliação de novas drogas antidepressivas, além de serem fáceis de execução e possuem confiabilidade. Eles fornecem um ambiente estressante, onde os

animais são colocados em uma situação inescapável, sendo a atividade antidepressiva de um composto expressa pela diminuição do tempo de imobilidade, principal preditor da atividade antidepressiva, onde a mudança comportamental se mostra sensível aos tratamentos antidepressivos (Bourin et al., 2005; Cryan et al., 2002).

Outro parâmetro utilizado para caracterizar a atividade tipo antidepressivo, embora com menos frequência, é a latência até a imobilidade. Os antidepressivos aumentam a latência para a imobilidade, e a adição dessa medida pode aumentar a sensibilidade do teste de desespero comportamental para certas classes de antidepressivos. Também é sugerido que os psicoestimulantes não afetam a latência para a imobilidade e o ganho de sensibilidade não esteja relacionado à estimulação motora geral (Castagné et al., 2009).

O TNF possui amplo espectro para testar a eficiência de antidepressivos com forte validade preditiva (Hao et al., 2019), tendo maior sensibilidade farmacológica que o teste da suspensão da cauda (Cryan et al., 2002). Em seu estudo, Calil et al. (2002) confirmaram que o comportamento de imobilidade no teste da natação forçada reflete uma tendência em adotar estratégias passivas em situações inescapáveis e aversivas ou um estado depressivo, efeitos estes que são revertidos pelos antidepressivos, e sugeriram que a imobilidade não estaria relacionada à ansiedade, confirmando os resultados de outros autores (Porsolt et al., 1977; Kawashima et al., 1986).

O TSC induz um estado de imobilidade nos animais diante de uma situação inescapável semelhante à observada no TNF (Bourin et al., 2005; Cryan et al., 2002). Comparado ao TNF, que apresenta apenas um risco leve para os animais, o TSC é um teste método de estimulação suave que não oferece risco de vida (Hao et al., 2019), porém, não é tão bem caracterizado quanto o TNF em termos da amplitude dos tratamentos testados ou do número de manipulações indutoras de depressão testadas, sendo seu uso melhor explorado como complemento de outros modelos de depressão, como TNF, desamparo aprendido e modelos de anedonia (Cryan et al., 2002). Provavelmente, eles se diferenciem em termos dos substratos biológicos que fundamentam o comportamento observado. Também existe uma diferença na resposta aos antidepressivos entre as cepas de camundongos utilizadas nestes testes, sendo os camundongos *Swiss* a cepa mais sensível para detectar diferentes antidepressivos (Bourin et al., 2005).

Em ambos os testes, os camundongos que tiveram administração de dexametasona diminuíram a latência para imobilidade e aumentaram o tempo de imobilidade no 8º e 15º dia, obtendo comportamento depressivo. Isso sugere que a dexametasona administrada em doses repetidas induz comportamento semelhante a depressivo nos animais. Outros estudos utili-

zando a dexametasona repetidamente em concentrações semelhantes ou diferentes em roedores (Abderrahim et al., 2022; Falade et al. 2021; Laaziz et al., 2022; Li et al., 2014; Mesripour & Rakhshankhah, 2021; Skupio et al., 2015; Wróbel et al, 2014), corroboram com os nossos resultados e sugerem comportamento do tipo depressivo, com o aumento de forma significativa do tempo de imobilidade ou diminuição da latência para imobilidade nestes testes, o que valida o modelo utilizado para a investigação da atividade antidepressiva do *o*-eugenol.

Diante dos estudos de toxicidade feitos e de estudos anteriores com o *o*-eugenol (Araújo, 2018; Fonsêca, 2016; Godoy et al., 2023), foi possível definir as doses do *o*-eugenol 25, 50 e 100 mg/kg para uso em doses repetidas com uma margem de segurança, as quais foram utilizadas nos testes farmacológicos de avaliação da atividade antidepressiva.

De acordo com os nossos resultados, *o*-eugenol, análogo do eugenol, um fenilpropanóide, nas doses repetidas de 25, 50 e 100 mg/kg, promoveu diminuição no tempo de imobilidade, revertendo o tempo de imobilidade induzido pela dexametasona no TSC e TNF, o que sugere um efeito antidepressivo. Dessa forma, os resultados observados no TSC corroboraram com os resultados obtidos no TNF em todas as doses testadas. A imipramina, antidepressivo usado como droga padrão, também diminuiu o tempo de imobilidade nestes testes.

De forma similar aos nossos achados, *o*-eugenol na dose de 50 mg/kg apresentou atividade antidepressiva-símile no modelo de depressão induzido por administração aguda de dexametasona (64 µg/kg s.c.), por meio da diminuição do tempo de imobilidade no TSC (Araújo, 2018). No estudo de Wróbel e colaboradores (2015), tanto a administração aguda quanto repetida das doses ativas de imipramina, zinco e cetamina, e as combinações de suas doses inativas reverteram a atividade inibitória da dexametasona (16 µg/kg/dia) administrada por 14 dias consecutivos no TNF. O tratamento com nortriptilina e venlafaxina bloqueou o aumento induzido pela dexametasona (0,07 mg/kg) em camundongos no TSC (De Souza et al., 2019).

O eugenol foi estudado nas doses 10, 30 e 100 mg/kg e apresentou atividade antidepressiva comparável à da imipramina de maneira dependente da dose, usando o TNF e TSC em camundongos após 14 dias de tratamento (Irie et al., 2004). O *bis*-eugenol, outro análogo do eugenol, administrado de forma aguda, diminuiu o tempo de imobilidade no TSC e TNF em camundongos nas três doses utilizadas, e a imipramina teve seu efeito esperado (Do Amaral et al., 2013). O ácido caféico, outro fenilpropanóide, em todas as doses do estudo agudo, reduziu o tempo de imobilidade dos camundongos avaliado pelo TSC (Dalmagro et al., 2022). O ácido elágico, composto polifenólico, quando administrado de forma aguda ou crônica em

camundongos, nas doses estudadas, reduziu o tempo de imobilidade em ensaios de TNF e TSC em camundongos (Girish et al., 2012).

Em outros tipos de estudos, a oleuropeína, um composto fenólico, em diferentes doses e a fluoxetina neutralizaram as alterações induzidas pela corticosterona em camundongos, diminuindo o tempo de mobilidade no TSC e TNF (Badr et al., 2020). As sapogeninas dammarane, uma fração ativa do *ginseng* oriental, diminuiu o tempo de imobilidade no TSC e TNF em camundongos submetidos apenas ao modelo de estresse crônico moderado e imprevisível (CUMS), o qual também induz um comportamento depressivo-símile nos animais (Jiang et al., 2018).

Quanto ao parâmetro de latência para imobilidade no TSC e TNF, o *o*-eugenol nas doses utilizadas aumentou a latência, contribuindo para reafirmar a atividade antidepressiva da substância. Apesar da análise deste parâmetro ser pouco utilizada nos estudos, é um parâmetro importante para avaliação dos efeitos das drogas. Adicionar a medida de latência para imobilidade pode aumentar a sensibilidade do teste de desespero comportamental no camundongo para certas classes de antidepressivos (Castagné et al., 2009; Castagné et al., 2010). No estudo de Araújo (2018), *o*-eugenol aumentou a latência para a imobilidade no TSC em grupos previamente tratados com dexametasona. A administração de vitamina B6 também causou um aumento na latência para imobilidade no TNF, além de prevenir o aumento no tempo de imobilidade induzido pela dexametasona em camundongos (Mesripour et al., 2019).

A fim de dar continuidade na avaliação da atividade antidepressiva, realizamos o teste de preferência por sacarose comumente indicado para avaliar a anedonia em animais e, quando comparado a outros testes, resulta em menos danos aos animais (Hao et al., 2019). Em relação à avaliação do consumo de água e solução de sacarose, uma ingestão reduzida de sacarose, interesse reduzido na recompensa, é um indicativo no animal de comportamento depressivo (Belovicova et al., 2017; Hao et al., 2019). Em contrapartida, a administração de antidepressivos clássicos como fluoxetina, imiprimina e clomipramina, aumentam o consumo da solução de sacarose em relação ao consumo de água no teste de preferência por sacarose em animais (Badr et al., 2020; Laaziz et al., 2022; Wang et al., 2020).

Em nosso estudo, na avaliação do parâmetro de preferência pela sacarose, o grupo tratado com dexametasona apresentou menor consumo de sacarose quando comparado aos demais grupos, enquanto que, *o*-eugenol, nas doses utilizadas, reverteu o comportamento, aumentando a preferência pela solução de sacarose. Em outro estudo, camundongos tratados com corticosterona apresentou menor consumo de sacarose quando comparado aos demais grupos e a administração de riparina IV, uma droga sintética de alcamidas, ou fluvoxamina foi

capaz de recuperar a preferência pela sacarose após a administração exógena de corticosterona (Chaves et al., 2019). Assim, nossos achados quando comparados a literatura sugerem que o *o*-eugenol apresentou efeito antidepressivo.

A coordenação motora é um indicador crucial para identificar possíveis efeitos colaterais de uma substância, como miorelaxamento ou neurotoxicidade. Assim, avaliamos a capacidade motora dos animais tratados com o *o*-eugenol por meio do teste do rota-rod e, mostrou que o tratamento não causou alterações na coordenação motora, descartando a possibilidade de que a diminuição da imobilidade ocasionada pelo *o*-eugenol poderia decorrer de um efeito miorelaxante ou neurotóxico. Similarmente, estudos anteriores também não observaram anormalidades significativas no teste de rota-rod durante a avaliação aguda de atividades anti-nociceptivas e anti-inflamatórias do *o*-eugenol (Fonsêca et al., 2016).

Zhao e colaboradores (2014) mostraram que a curcumina, um polifenol, quando administrada de forma crônica e oral em camundongos, pode normalizar os comportamentos depressivos, usando o TNF e TSC, induzidos pela dor neuropática e que não devem ser explicados por possíveis efeitos colaterais sobre desempenho motor por não ter alteração no teste do *rota-rod*. No estudo de Campos et al., 2019, o citral, um monoterpeno, presente no óleo essencial de *Cymbopogon citratus*, também não alterou a coordenação motora quando comparado ao grupo controle.

Observando que o *o*-eugenol apresentou efeito antidepressivo similar a imipramina, um antidepressivo tricíclico que exerce uma ação bifásica (anti/pró-convulsivante) no SNC, manifestada por propriedades anticonvulsivas em doses baixas e efeitos pró-convulsivos em doses mais altas (Lange et al., 1976; Löscher, 2009), avaliamos se o *o*-eugenol também apresentaria esse efeito colateral pró-convulsivante. Utilizamos o modelo de convulsões induzidas por pentilenotetrazol (PTZ). O PTZ, estimulante do SNC, é uma droga pró-convulsiva em doses subconvulsivas diminuindo a latência das convulsões, e convulsivante em doses altas (Löscher, 2009). No presente estudo, a administração oral aguda de *o*-eugenol (25, 50 e 100 mg/kg), antes da administração de PTZ em dose subconvulsivante, aumentou a latência da convulsão clônica, demonstrando o efeito protetor do *o*-eugenol. Em contrapartida, doses altas, consideradas terapêuticas, de imipramina associada ao PTZ em doses subconvulsivante diminui a latência da convulsão clônica, indicando um papel pró-convulsivante deste antidepressivo. De forma semelhante, Monteiro e colaboradores (2020) encontraram que a associação de PTZ em dose subconvulsivante com bupropiona, ou fluoxetina, ou extrato hidroetanólico das folhas de *Annona coriácea* ou com ácido caféico aumentaram significativamente a latência para a primeira crise convulsiva, enquanto que, a associação de PTZ em dose sub-

convulsivante com a imipramina 30 mg/kg também reduziu significativamente a latência para a primeira crise. Assim, demonstramos que o *o*-eugenol é desprovido do efeito colateral proconvulsivante nas três doses testadas.

Examinando o possível efeito sinérgico da co-administração da imipramina e *o*-eugenol, os resultados obtidos mostraram que os camundongos que tiveram a co-administração da imipramina e *o*-eugenol em doses subeficazes aumentaram da latência e diminuição do tempo de imobilidade no teste do nado forçado em relação aos que tiveram apenas a administração dessas substâncias de forma isolada. Também o efeito da co-administração das substâncias foi comparável ao efeito da imipramina em dose eficaz (15 mg/kg). Nossos resultados são sugestivos de uma interação sinérgica entre a imipramina e o *o*-eugenol, podendo representar no futuro uma terapia alternativa para a depressão. Outros estudos encontraram efeito sinérgico de diferentes substâncias com a imipramina. No trabalho de Hassanzadeh e colaboradores (2022), o co-tratamento de uma dose subeficaz de *trans*-anetol, um fenilpropanóide, com imipramina ou fluoxetina induziu efeitos sinérgicos do tipo antidepressivo no teste do nado forçado. No estudo de Khakpai e colaboradores (2021), a co-administração de diferentes doses de imipramina juntamente com uma dose ineficaz de citicolina, precursor da fosfatidilcolina, diminuiu o tempo de imobilidade no teste do nado forçado, sugerindo efeito sinérgico entre a imipramina e a citicolina na indução de efeitos antidepressivos. Dessa forma, a aplicação de novos fármacos pode aumentar a eficácia das propriedades antidepressivas e/ou reduzir efeitos colaterais com a redução nas doses administradas de medicamentos já utilizados.

Para explorar os possíveis mecanismos de ação *o*-eugenol, foram avaliados os efeitos do tratamento com *o*-eugenol sobre o estresse oxidativo por meio da determinação da concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARs), um índice de peroxidação lipídica, e da concentração de glutathiona reduzida (GSH).

Existe uma correlação entre o aumento do estresse oxidativo e o transtorno depressivo, apoiada pela atividade antidepressiva de vários antioxidantes em diferentes modelos de depressão em animais (Di Lorenzo et al., 2016; Badr et al., 2020; Nabavi et al., 2018). Também existem associações entre o comportamento depressivo de animais e o aumento do estresse oxidativo em áreas específicas do cérebro, como o hipocampo e o córtex cerebral (Budni et al., 2013; Laaziz et al., 2022; Shuster et al., 2022).

A peroxidação lipídica, especialmente de ácidos graxos das membranas, desempenha um papel importante na lesão tecidual (Dal-Pizzol et al., 2000). No presente estudo, os peróxidos lipídicos foram determinados como substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

(TBARS) no hipocampo dos camundongos, e refletem a formação de malondialdeído, um produto final da peroxidação de ácidos graxos da membrana (Draper & Hadley, 1990). A dexametasona induziu um desequilíbrio oxidativo, o que é evidenciado pelo aumento dos níveis de TBARS em relação ao controle. Outros trabalhos também encontraram resultados semelhantes em relação ao aumento dos níveis de TBARS pela dexametasona em roedores (Falade et al., 2021; Laaziz et al., 2022; Patel et al., 2014).

A administração de doses repetidas do *o*-eugenol, nas três doses utilizadas, reduziu o TBARS, revertendo o aumento do TBARS induzido pela dexametasona no hipocampo. Além disso, as doses de 50 e 100 mg/kg também diminuíram TBARS em relação ao grupo controle. A diminuição da peroxidação lipídica do *o*-eugenol, determinado por TBARS, também foi encontrado em administração aguda em camundongos por Godoy e colaboradores (2023). Um efeito semelhante do eugenol também foi relatado em ratos (Nagababu et al., 2010). O ácido gálico, outro fenilpropanóide, possuiu atividade antidepressiva no TNF e preferência a sacarose, e diminuiu os níveis de TBARS em camundongos submetidos a estresse leve crônico imprevisível (Chhillar & Dhingra, 2013).

Outro importante sistema antioxidante é a glutathiona reduzida (GSH), um antioxidante endógeno não enzimático que desempenha papel importante na desintoxicação de xenobióticos eletrofílicos, produzindo compostos menos tóxicos (Jakoby, 1978). O tratamento com a dexametasona não diminuiu de forma significativa os níveis de glutathiona no córtex pré-frontal, entretanto, o *o*-eugenol na dose de 50 mg/kg apresentou um aumento significativo de GSH em relação ao controle e ao grupo da dexametasona. A ausência de alterações nos níveis de GSH como resultado da administração do glicocorticoide sugere que este antioxidante não desempenha um papel significativo neste modelo nas condições empregadas neste estudo. No entanto, poucos são os estudos utilizando a avaliação dos níveis de glutathiona na indução do comportamento depressivo pela dexametasona. No estudo de Alsadee e Agbashee (2021), utilizaram uma dose maior de dexametasona (1 mg/kg por 14 dias) e ela, além de elevar os níveis de TBARS, também diminuiu de forma significativa os níveis de GSH no fígado e rim de ratos, enquanto que, o extrato de semente de *Lepidium sativum* diminuiu a peroxidação lipídica e melhorou os níveis do GSH. No nosso estudo, o *o*-eugenol também apresentou um efeito benéfico na elevação do antioxidante não enzimático. Assim, é cada vez mais notável que antioxidantes naturais com estrutura fenólica possuem um papel importante na proteção contra o dano oxidativo por radicais livres e peroxidação lipídica (Nagababu et al., 2010; Nisar et al., 2021; Shuster et al., 2022).

A neuroinflamação e desequilíbrios de citocinas podem causar e/ou manter a depressão, afetando padrões de transmissão de sinais cerebrais, interferindo no eixo HPA, neurotransmissores, sistema nervoso autônomo e plasticidade neural. O estresse, por sua vez, funciona como um indutor da secreção excessiva de citocinas pró-inflamatórias, o que resulta em sintomas depressivos (Jeon & Kim, 2016; Nettis & Pariante, 2020). Entre as citocinas pró-inflamatórias, a interleucina-1 (IL-1), produzida após exposição a desafios imunológicos e psicológicos, desempenha um papel importante nas respostas neuroendócrinas e comportamentais ao estresse, contribuindo para a ativação do eixo HPA e secreção de glicocorticoides. Níveis baixos dessa interleucina são benéficos, enquanto níveis elevados estão associados à depressão, incluindo sintomas comportamentais, ativação adrenocortical e redução da neurogênese no hipocampo (Goshen & Yirmiya, 2009).

Os antidepressivos podem inibir a produção e função de citocinas periféricas e cerebrais, diminuindo os níveis de citocinas pró-inflamatórias (Jeon & Kim, 2016; Nettis & Pariante, 2020). Em nosso estudo foi medido os níveis séricos de IL-1 β dos animais e o grupo tratado com *o*-eugenol 50 mg/kg diminuiu significativamente o nível sérico de IL-1 β em relação aos grupos controle e dexametasona, sugerindo que seu efeito antidepressivo possa estar associado à inibição do processo neuroinflamatório. O ácido salvianólico B, um polifenol, diminuiu significativamente a expressão das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e TNF- α no hipocampo e córtex de camundongos tratados com estresse crônico moderado (Zhang et al., 2016).

Porém, não houve diferença significativa entre o controle e o grupo da dexametasona em relação aos níveis de IL-1 β . Jeon e Kim (2016) sugerem que, na depressão, o aumento de glicocorticóides induzido pela ativação do eixo HPA e o aumento de citocinas resultante da ativação imunológica provavelmente não ocorrerão ao mesmo tempo. Em estudo realizado por Hu et al. (2016), mostrou que o tratamento com dexametasona (5 mg/kg), por 7 dias e 14 dias não teve efeitos significativos na expressão de IL-1 β , enquanto que esse mesmo tratamento por 21 dias e 28 dias aumentou significativamente a expressão de IL-1 β no córtex frontal e no hipocampo de camundongos.

A metabolômica estuda o conjunto de metabólitos de um determinado sistema biológico e ajuda a entender as interações dentro desse sistema. Metabólitos são produtos do metabolismo com tamanho menor que 1500 Da que descrevem o status de um sistema biológico de uma maneira diferente. Atualmente, é necessário analisar o metaboloma e as vias envolvidas em condições saudáveis, como também em situações de doenças, para possíveis aplicações terapêuticas (Muthubharathi et al., 2021). No caso do SNC, a análise da atividade da rede me-

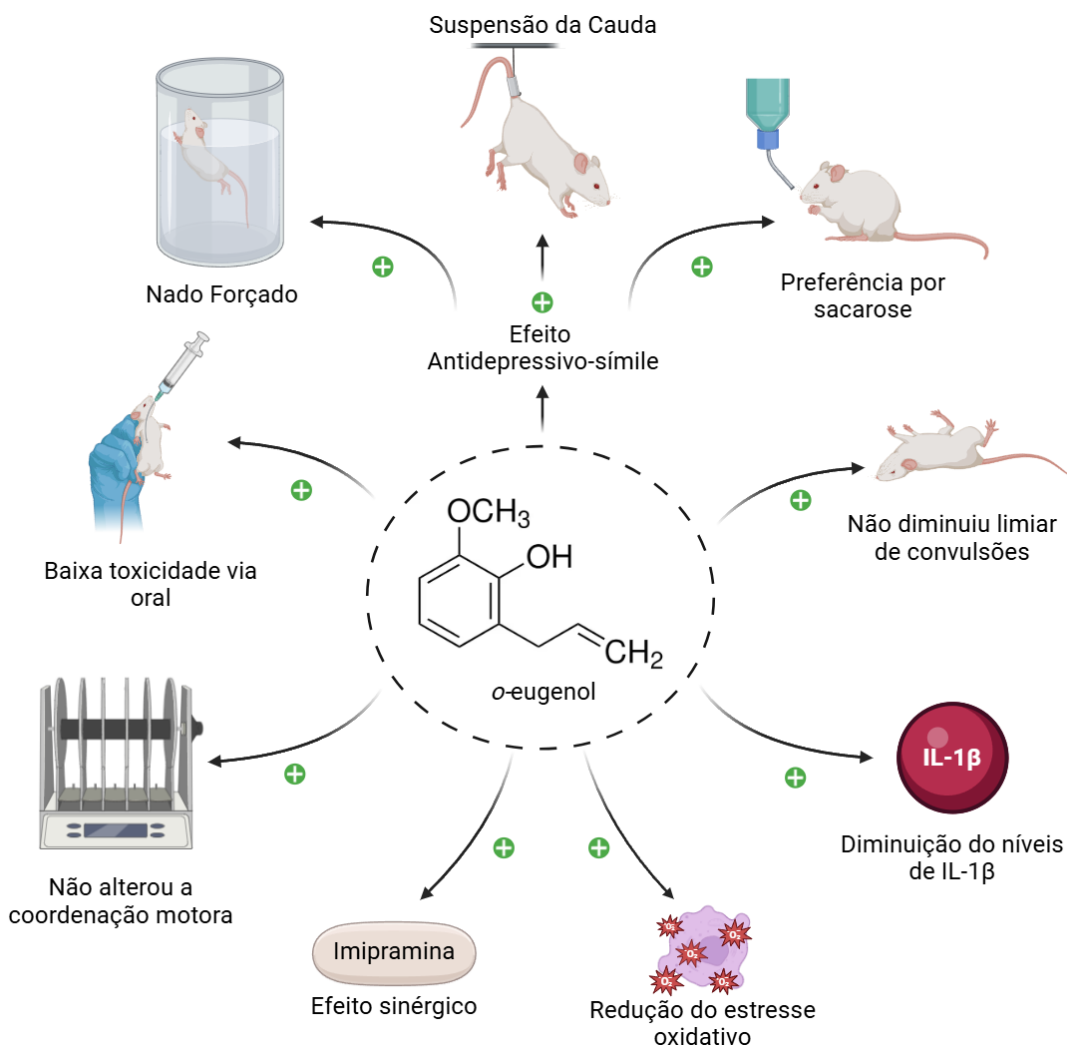
tabólica pode aumentar nosso conhecimento sobre a estrutura complexa do cérebro e os mecanismos de distúrbios neurológicos, levando ao *design* de tratamentos terapêuticos mais eficazes (Vasilopoulou et al., 2016). O PCA, empregado para processar os dados de RMN, é uma técnica estatística amplamente usada que reduz a dimensionalidade de grandes conjuntos de dados e facilita a interpretabilidade, minimizando a perda de informações (Castura et al., 2022). No estudo, os gráficos de PCA dos diferentes grupos se apresentaram semelhantes. Uma limitação é a sensibilidade do aparelho de 400 MHz. Outros testes poderiam ser feitos com sensibilidade maiores, como a utilização de um espectrômetro com um campo de alta intensidade (> 400 MHz) (Dalitz et al., 2012).

O aparecimento de substâncias mais eficazes e com menos efeitos colaterais é necessário para o tratamento da depressão e melhoria da qualidade de vida dos pacientes. Diante dos resultados, o-eugenol mostrou-se ter uma boa atividade antidepressiva que pode estar relacionada a diminuição do estresse oxidativo, efeito anti-inflamatório, além de, possuir efeito sinérgico com a imipramina e baixa toxicidade.

8 CONCLUSÕES

Diante dos resultados obtidos no presente estudo em camundongos, fêmeas, foi possível concluir que *o*-eugenol (Figura 31):

Figura 31 – Efeitos do *o*-eugenol no estudo.



- Demonstrou uma boa segurança e tolerabilidade no estudo *in silico*;
- Possui relativamente baixa toxicidade aguda e de doses repetidas por via oral *in vivo*, não apresentando alterações na maioria dos parâmetros avaliados;
- Apresentou, nas três doses estudadas, atividade antidepressiva nos testes comportamentais (nado forçado, suspensão pela cauda e preferência por sacarose) no modelo de depressão animal por administração de doses repetidas de dexametasona;
- Não alterou a coordenação motora dos animais;
- Mostrou efeito sinérgico com a imipramina;

- f) Não diminuiu o limiar de convulsões;
- g) Reduziu os níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (um indicador de peroxidação lipídica) e aumentou os níveis do antioxidante natural não-enzimático glutathione;
- h) Diminuiu os níveis séricos de IL-1 β , sugerindo atividade anti-inflamatória;
- i) Não promoveu diferenças importantes no perfil químico do hipocampo entre os grupos pela análise do PCA.

Além disso, também foi mimetizado o comportamento depressivo-símile associado ao modelo da administração repetida de dexametasona em camundongos.

REFERÊNCIAS

- Abbasi-Maleki, S., & Mousavi, Z. (2017). Hydroethanolic extract of *Carthamus tinctorius* induces antidepressant-like effects: modulation by dopaminergic and serotonergic systems in tail suspension test in mice. *Iranian journal of basic medical sciences*, 20(9), 1063-1073. <https://doi.org/10.22038/IJBMS.2017.9277>
- Abderrahim, L., Hicham, E. M., Aboubaker, E., Fatima, A., Tarik, T., Soufiane, B., & Abdelhalim, M. (2022). Sex differences in behavioral, cognitive and voluntary ethanol-intake effects in Dexamethasone-induced depression-like state in Wistar rat. *AIMS neuroscience*, 9(2), 228-249. <https://doi.org/10.3934/Neuroscience.2022012>
- Ahmed, S., Moussa, F., Moustafa, A., Ayoub, D.R. (2016). Cortisol level in depressed patients and its relation with suicidal risk and anhedonia. *The Egyptian Journal of Neurology, Psychiatry and Neurosurgery*, 53(4), 193-199. <https://doi.org/10.4103/1110-1083.202375>
- Akbar, L., Juliandi, B., Boediono, A., Batubara, I., & Subangkit, M. (2021). Effects of Eugenol on Memory Performance, Neurogenesis, and Dendritic Complexity of Neurons in Mice Analyzed by Behavioral Tests and Golgi Staining of Brain Tissue. *Journal of stem cells & regenerative medicine*, 17(1), 35-41. <https://doi.org/10.46582/jsrm.1701005>
- Al Shoyaib, A., Archie, S. R., & Karamyan, V. T. (2019). Intraperitoneal Route of Drug Administration: Should it Be Used in Experimental Animal Studies? *Pharmaceutical research*, 37(1), 12. <https://doi.org/10.1007/s11095-019-2745-x>
- Alawie, H., Hu, J. C., & McLeod, A. (2020). What are the Recurring Theories Regarding the Pathogenesis of Major Depressive Disorder? *Undergraduate Research in Natural and Clinical Science and Technology Journal*, 1-8. <https://doi.org/10.26685/urncst.215>
- Alheira, F. V., & Brasil, M. A. A. (2005). O papel dos glicocorticóides na expressão dos sintomas de humor: uma revisão. *Revista de Psiquiatria do Rio Grande do Sul*, 27, 177-186. <https://doi.org/10.1590/S0101-81082005000200008>
- Almeida, R. N., & Oliveira, T. M. L. (2006). Triagem farmacológica comportamental. In R. N. Almeida (Org.). *Psicofarmacologia: fundamentos práticos* (1ª ed., pp. 131-137). Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
- Almeida, R. N., Falcão, A. C. G. M., Diniz, R. S. T., Quintans-Júnior, I. J., Polari, R. M., Barbosa-Filho, J. M., Agra, M. F., Duarte, J. C., Ferreira, C. D., Antonioli, A. R., & Araujo, C. C. (1999). Metodologia para avaliação de plantas com atividade no sistema nervoso central e alguns dados experimentais. *Revista Brasileira de Farmácia*, 80(3/4), 72-76.

- Alsadee, A., & Agbashee, S. (2021). Hepato-nephroprotective Role of *Lepidium sativum* against Oxidative Stress Induced by Dexamethasone in Rats. *Indian Journal of Forensic Medicine & Toxicology*, 15(1). <https://doi.org/10.37506/ijfmt.v15i1.13797>
- American Psychiatric Association (2014). *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*, (5^a ed). (DSM-V), Porto Alegre: Artmed.
- Anacker, C., Zunszain, P. A., Carvalho, L. A., & Pariante, C. M. (2011). The glucocorticoid receptor: pivot of depression and of antidepressant treatment? *Psychoneuroendocrinology*, 36(3), 415–425. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2010.03.007>
- Andrade, A., Pinto, S. C., & Oliveira, R. S. D. (2002). *Animais de laboratório: Criação e experimentação*. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz.
- Andreakos, E., Papadaki, M., & Serhan, C. N. (2021). Dexamethasone, pro-resolving lipid mediators and resolution of inflammation in COVID-19. *Allergy*, 76(3), 626-628. <https://doi.org/10.1111/all.14595>
- Angeloni, C., Malaguti, M., Barbalace, M. C., & Hrelia, S. (2017). Bioactivity of Olive Oil Phenols in Neuroprotection. *International journal of molecular sciences*, 18(11), 2230. <https://doi.org/10.3390/ijms18112230>
- Antunes, M. S., Jesse, C. R., Ruff, J. R., de Oliveira Espinosa, D., Gomes, N. S., Altvater, E., Donato, F., Giacomeli, R., & Boeira, S. P. (2016). Hesperidin reverses cognitive and depressive disturbances induced by olfactory bulbectomy in mice by modulating hippocampal neurotrophins and cytokine levels and acetylcholinesterase activity. *European journal of pharmacology*, 789, 411–420. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2016.07.042>
- ANVISA (2013). *Guia para a condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos*. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília, Brasil.
- Aponso, M., Patti, A., & Bennett, L. E. (2020). Dose-related effects of inhaled essential oils on behavioural measures of anxiety and depression and biomarkers of oxidative stress. *Journal of ethnopharmacology*, 250, 112469. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2019.112469>
- Araújo, A. N. V. (2018). *Investigação da atividade antidepressiva do orto Eugenol em modelos comportamentais de depressão induzidos por dexametasona*. Dissertação de mestrado. Programa de Pós-Graduação em Neurociência Cognitiva e Comportamento, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB, Brasil.

- Archer, J. (1973). Tests for emotionality in rats and mice: a review. *Animal behaviour*, 21(2), 205-235.
- Artigas, F., Nutt, D. J., & Shelton, R. (2002). Mechanism of action of antidepressants. *Psychopharmacology bulletin*, 36 Suppl 2, 123-132.
- Ashrafudoulla, M., Mizan, M., Ha, A. J., Park, S. H., & Ha, S. D. (2020). Antibacterial and antibiofilm mechanism of eugenol against antibiotic resistance *Vibrio parahaemolyticus*. *Food microbiology*, 91, 103500. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2020.103500>
- Ataei, S., Azari, P., Hassan, A., Pingguan-Murphy, B., Yahya, R., & Muhamad, F. (2020). Essential oils-loaded electrospun biopolymers: A future perspective for active food packaging. *Advances in Polymer Technology*, 2020, 1-21. <https://doi.org/10.1155/2020/9040535>
- Audet, MC, McQuaid, RJ, Merali, Z., & Anisman, H. (2014). Variações de citocinas e transtornos de humor: influência de estressores sociais e suporte social. *Fronteiras em neurociência*, 8, 416. <https://doi.org/10.3389/fnins.2014.00416>
- Badr, A. M., Attia, H. A., & Al-Rasheed, N. (2020). Oleuropein reverses repeated corticosterone-induced depressive-like behavior in mice: evidence of modulating effect on biogenic amines. *Scientific reports*, 10(1), 1-10. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-60026-1>
- Bahramsoltani, R., Farzaei, M. H., Farahani, M. S., & Rahimi, R. (2015). Phytochemical constituents as future antidepressants: a comprehensive review. *Reviews in the neurosciences*, 26(6), 699–719. <https://doi.org/10.1515/revneuro-2015-0009>
- Bai, Y., Song, L., Dai, G., Xu, M., Zhu, L., Zhang, W., Jing, W., & Ju, W. (2018). Antidepressant effects of magnolol in a mouse model of depression induced by chronic corticosterone injection. *Steroids*, 135, 73-78. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2018.03.005>
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., & Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils--a review. *Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, 46(2), 446-475. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.09.106>
- Becher, B., Spath, S., & Gorman, J. (2017). Cytokine networks in neuroinflammation. *Nature reviews. Immunology*, 17(1), 49-59. <https://doi.org/10.1038/nri.2016.123>
- Becker, M., Pinhasov, A., & Ornoy, A. (2021). Animal models of depression: what can they teach us about the human disease? *Diagnostics*, 11(1), 123. <https://doi.org/10.3390/diagnostics11010123>

- Belleau, E. L., Treadway, M. T., & Pizzagalli, D. A. (2019). The Impact of Stress and Major Depressive Disorder on Hippocampal and Medial Prefrontal Cortex Morphology. *Biological psychiatry*, 85(6), 443-453. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2018.09.031>
- Belmaker, R. H., & Agam, G. (2008). Major depressive disorder. *The New England journal of medicine*, 358(1), 55-68. <https://doi.org/10.1056/NEJMra073096>
- Belovicova, K., Bogi, E., Csatosova, K., & Dubovicky, M. (2017). Animal tests for anxiety-like and depression-like behavior in rats. *Interdisciplinary toxicology*, 10(1), 40–43. <https://doi.org/10.1515/intox-2017-0006>
- Benkelfat, C., Ellenbogen, M. A., Dean, P., Palmour, R. M., & Young, S. N. (1994). Mood-lowering effect of tryptophan depletion. Enhanced susceptibility in young men at genetic risk for major affective disorders. *Archives of general psychiatry*, 51(9), 687-697. <https://doi.org/10.1001/archpsyc.1994.03950090019003>
- Beroza, M., Inscoe, M. N., Schwartz, P. H., Jr, Keplinger, M. L., & Mastri, C. W. (1975). Acute toxicity studies with insect attractants. *Toxicology and applied pharmacology*, 31(3), 421-429. [https://doi.org/10.1016/0041-008x\(75\)90264-1](https://doi.org/10.1016/0041-008x(75)90264-1)
- Bezerra, D. P., Militão, G., de Moraes, M. C., & de Sousa, D. P. (2017). The Dual Antioxidant/Prooxidant Effect of Eugenol and Its Action in Cancer Development and Treatment. *Nutrients*, 9(12), 1367. <https://doi.org/10.3390/nu9121367>
- Bhatt, S., Nagappa, A. N., & Patil, C. R. (2020). Role of oxidative stress in depression. *Drug discovery today*, 25(7), 1270–1276. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2020.05.001>
- Bitew, M., Desalegn, T., Demissie, T. B., Belayneh, A., Endale, M., & Eswaramoorthy, R. (2021). Pharmacokinetics and drug-likeness of antidiabetic flavonoids: Molecular docking and DFT study. *PloS one*, 16(12), e0260853. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0260853>
- Bloch, M., Daly, R. C., & Rubinow, D. R. (2003). Endocrine factors in the etiology of postpartum depression. *Comprehensive psychiatry*, 44(3), 234-246. [https://doi.org/10.1016/S0010-440X\(03\)00034-8](https://doi.org/10.1016/S0010-440X(03)00034-8)
- Bomfim de Sá, C., Brito Lira, A., Filho, A. A. O., de Oliveira, K. M., Rolim da Paz, A., Castro de Moraes, M., de Sousa, D. P., Tafaela Dias, G., Rodrigues Melo, C., Pessôa, H. L. F., Maria Bezerra Luna Lima, C., & de Fátima Formiga Melo Diniz, M. (2022). *In silico*, *in vitro*, and *in vivo* investigation of antioxidant potential and toxicity of ethyl ferulate. *Drug and chemical toxicology*, 45(4), 1769-1779. <https://doi.org/10.1080/01480545.2021.1878207>

- Bourin, M., Chenu, F., Ripoll, N., & David, D. J. (2005). A proposal of decision tree to screen putative antidepressants using forced swim and tail suspension tests. *Behavioural brain research*, 164(2), 266-269. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2005.06.015>
- Brigitta B. (2002). Pathophysiology of depression and mechanisms of treatment. *Dialogues in clinical neuroscience*, 4(1), 7-20. <https://doi.org/10.31887/DCNS.2002.4.1/bbondy>
- Budni, J., Zomkowski, A. D., Engel, D., Santos, D. B., dos Santos, A. A., Moretti, M., Valvassori, S. S., Ornell, F., Quevedo, J., Farina, M., & Rodrigues, A. L. (2013). Folic acid prevents depressive-like behavior and hippocampal antioxidant imbalance induced by restraint stress in mice. *Experimental neurology*, 240, 112-121. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2012.10.024>
- Calil, C. M., Bianchi, F. J., Tanno, A. P., Cunha, T. D. S. D., & Marcondes, F. K. (2002). Análise do significado do tempo de imobilidade em modelos experimentais de natação. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 38, 479-485. <https://doi.org/10.1590/S1516-93322002000400011>
- Campos, C. A., Lima, B. S., Trindade, G. G. G., Souza, E. P. B. S. S., Mota, D. S. A., Heimfarth, L., Quintans, J. S. S., Quintans-Júnior, L. J., Sussuchi, E. M., Sarmiento, V. H. V., Carvalho, F. M. S., Marreto, R. N., Costa, R. M. R., Nunes, R. S., Araújo, A. A. S., Shanmugam, S., & Thangaraj, P. (2019). Anti-hyperalgesic and anti-inflammatory effects of citral with β -cyclodextrin and hydroxypropyl- β -cyclodextrin inclusion complexes in animal models. *Life sciences*, 229, 139-148. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.05.026>
- Can, A., Dao, D. T., Arad, M., Terrillion, C. E., Piantadosi, S. C., & Gould, T. D. (2012). The mouse forced swim test. *Journal of visualized experiments: JoVE*, (59), e3638. <https://doi.org/10.3791/3638>
- Cardiff, R. D., Miller, C. H., & Munn, R. J. (2014). Manual hematoxylin and eosin staining of mouse tissue sections. *Cold Spring Harbor protocols*, 2014(6), 655-658. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot073411>
- Carlini, E. A. (1979). Screening farmacológico de ansiolíticos: metodologia laboratorial e comparação entre o diazepam eo clorobenzapam. *Revista da Associação Brasileira de Psiquiatria*, 1, 25-31.
- Castagné, V., Moser, P., Roux, S., & Porsolt, R. D. (2010). Rodent models of depression: forced swim and tail suspension behavioral despair tests in rats and mice. *Current protocols in pharmacology*, 49(1), 5-8. <https://doi.org/10.1002/0471141755.ph0508s49>

- Castagné, V., Porsolt, R. D., & Moser, P. (2009). Use of latency to immobility improves detection of antidepressant-like activity in the behavioral despair test in the mouse. *European journal of pharmacology*, 616(1-3), 128–133.
<https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2009.06.018>
- Castro, J. A. (1993). Toxicología básica: mecanismos de toxicidad y sus aplicaciones. *Acta bioquím. clín. latinoam*, 197-206.
- Castura, J. C., Rutledge, D. N., Ross, C. F., & Naes, T. (2022). Discriminability and uncertainty in principal component analysis (PCA) of temporal check-all-that-apply (TCATA) data. *Food Quality and Preference*, 96, [104370].
<https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2021.104370>
- Chai, A. B., Callaghan, R., & Gelissen, I. C. (2022). Regulation of P-Glycoprotein in the Brain. *International journal of molecular sciences*, 23(23), 14667.
<https://doi.org/10.3390/ijms232314667>
- Chaves, R. C., Mallmann, A. S. V., Oliveira, N. F., Oliveira, I. C. M., Capibaribe, V. C. C., da Silva, D. M. A., Lopes, I. S., Valentim, J. T., de Carvalho, A. M. R., Macêdo, D. S., Vasconcelos, S. M. M., Gutierrez, S. J. C., Barbosa Filho, J. M., & de Sousa, F. C. F. (2019). Reversal effect of Riparin IV in depression and anxiety caused by corticosterone chronic administration in mice. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*, 180, 44–51. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2019.03.005>
- Chaves, R. C., Mallmann, A., de Oliveira, N. F., Capibaribe, V., da Silva, D., Lopes, I. S., Valentim, J. T., Barbosa, G. R., de Carvalho, A., Fonteles, M., Gutierrez, S., Barbosa Filho, J. M., & de Sousa, F. (2020). The neuroprotective effect of Riparin IV on oxidative stress and neuroinflammation related to chronic stress-induced cognitive impairment. *Hormones and behavior*, 122, 104758.
<https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2020.104758>
- Chhillar, R., & Dhingra, D. (2013). Antidepressant-like activity of gallic acid in mice subjected to unpredictable chronic mild stress. *Fundamental & clinical pharmacology*, 27(4), 409-418. <https://doi.org/10.1111/j.1472-8206.2012.01040.x>
- Chorilli, M., Paganotte, D. & Salgado, H. (2009). Animais de laboratório: o camundongo. *Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.*, 28 (1), 11-23.
- Choudhury, M., Ramakrishnan, E., & Devi, D. (2019). Identification and Characterization of Methyl Isoeugenol Compound from the Golden Yellow Hued Muga Silk Fiber of India. *Journal of Natural Fibers*, 1-14. <https://doi.org/10.1080/15440478.2019.1686677>

- Conti, M., Spulber, S., Raciti, M., & Ceccatelli, S. (2017). Depressive-like phenotype induced by prenatal dexamethasone in mice is reversed by desipramine. *Neuropharmacology*, 126, 242–249. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2017.09.015>
- Correia, A. S., Cardoso, A., & Vale, N. (2023). Oxidative Stress in Depression: The Link with the Stress Response, Neuroinflammation, Serotonin, Neurogenesis and Synaptic Plasticity. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 12(2), 470. <https://doi.org/10.3390/antiox12020470>
- Cryan, J. F., Markou, A., & Lucki, I. (2002). Assessing antidepressant activity in rodents: recent developments and future needs. *Trends in pharmacological sciences*, 23(5), 238–245. [https://doi.org/10.1016/s0165-6147\(02\)02017-5](https://doi.org/10.1016/s0165-6147(02)02017-5)
- Curtin, S. C., Warner, M., & Hedegaard, H. (2016). Increase in Suicide in the United States, 1999–2014. *NCHS data brief*, (241), 1–8.
- Czéh, B., Fuchs, E., Wiborg, O., & Simon, M. (2016). Animal models of major depression and their clinical implications. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry*, 64, 293–310. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2015.04.004>
- Da Guedes, E., Ribeiro, L. R., Carneiro, C. A., Santos, A. M. F., Brito Monteiro, Á., de Andrade, H. H. N., Castro, R. D., Barbosa, F. F., Barbosa Filho, J. M., de Almeida, R. N., & Stiebbe Salvadori, M. G. (2022). Anticonvulsant Activity of *trans*-Anethole in Mice. *BioMed research international*, 2022, 9902905. <https://doi.org/10.1155/2022/9902905>
- Dabbah-Assadi, F., Handel, R., & Shamir, A. (2022). What we know about the role of corticosteroids in psychiatric disorders; evidence from animal and clinical studies. *Journal of psychiatric research*, 155, 363–370. <https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2022.09.032>
- Daina, A., & Zoete, V. (2016). A BOILED-Egg To Predict Gastrointestinal Absorption and Brain Penetration of Small Molecules. *ChemMedChem*, 11(11), 1117–1121. <https://doi.org/10.1002/cmdc.201600182>
- Daina, A., Michielin, O., & Zoete, V. (2017). SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *Scientific reports*, 7, 42717. <https://doi.org/10.1038/srep42717>
- Dalitz, F., Cudaj, M., Maiwald, M., & Guthausen, G. (2012). Process and reaction monitoring by low-field NMR spectroscopy. *Progress in nuclear magnetic resonance spectroscopy*, 60, 52–70. <https://doi.org/10.1016/j.pnmrs.2011.11.003>

- Dalmagro, A. P., Holzmann, I., Zimath, P. L., Cazarin, C. A., & Souza, M. M. D. (2022). Antidepressant-like effect of caffeic acid: Involvement of the cellular signaling pathways. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 58. <https://doi.org/10.1590/s2175-97902022e20023>
- Dal-Pizzol, F., Klamt, F., Vianna, M. M., Schröder, N., Quevedo, J., Benfato, M. S., Moreira, J. C., & Walz, R. (2000). Lipid peroxidation in hippocampus early and late after status epilepticus induced by pilocarpine or kainic acid in Wistar rats. *Neuroscience letters*, 291(3), 179-182. [https://doi.org/10.1016/s0304-3940\(00\)01409-9](https://doi.org/10.1016/s0304-3940(00)01409-9)
- Dantzer, R., O'Connor, J. C., Freund, G. G., Johnson, R. W., & Kelley, K. W. (2008). From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain. *Nature reviews. Neuroscience*, 9(1), 46–56. <https://doi.org/10.1038/nrn2297>
- De Almeida, R. N., Agra, M., Maior, F. N., & de Sousa, D. P. (2011). Essential oils and their constituents: anticonvulsant activity. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 16(3), 2726-2742. <https://doi.org/10.3390/molecules16032726>
- De Oliveira, A. S., de Lima, A. M. S., Segati, K. D., & Pinto, E. M. H. (2022). Hemograma: correlação entre a hemoglobina e os índices hematimétricos / Blood count: correlation between hemoglobin and hematimetric índices. *Brazilian Journal of Development*, 8(2), 13304-13316. <https://revistasfacesa.senaaires.com.br/index.php/iniciacao-cientifica/article/view/174>
- De Souza, I., Costa, L., Tiago, P., Cagni, F. C., Lima, R. H., Silva Junior, E. D., & Gavioli, E. C. (2019). Venlafaxine and nortriptyline reverse acute dexamethasone-induced depressive-like behaviors in male and female mice. *Experimental and clinical psychopharmacology*, 27(5), 433-442. <https://doi.org/10.1037/pha0000263>
- Dean, J., & Keshavan, M. (2017). The neurobiology of depression: An integrated view. *Asian journal of psychiatry*, 27, 101-111. <https://doi.org/10.1016/j.ajp.2017.01.025>
- Dereli, F., Ilhan, M., & Akkol, E. K. (2019). New Drug Discovery from Medicinal Plants and Phytoconstituents for Depressive Disorders. *CNS & neurological disorders drug targets*, 18(2), 92-102. <https://doi.org/10.2174/1871527317666181114141129>
- Di Lorenzo, A., Nabavi, S. F., Sureda, A., Moghaddam, A. H., Khanjani, S., Arcidiaco, P., Nabavi, S. M., & Daglia, M. (2016). Antidepressive-like effects and antioxidant activity of green tea and GABA green tea in a mouse model of post-stroke depression. *Molecular nutrition & food research*, 60(3), 566–579. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201500567>

- Do Amaral, J. F., Silva, M. I., de Aquino Neto, M. R., Moura, B. A., de Carvalho, A. M., Vasconcelos, P. F., Barbosa Filho, J. M., Gutierrez, S. J., Vasconcelos, S. M., Macêdo, D. S., & de Sousa, F. C. (2013). Antidepressant-like effect of bis-eugenol in the mice forced swimming test: evidence for the involvement of the monoaminergic system. *Fundamental & clinical pharmacology*, 27(5), 471-482. <https://doi.org/10.1111/j.1472-8206.2012.01058.x>
- Dowlati, Y., Herrmann, N., Swardfager, W., Liu, H., Sham, L., Reim, E. K., & Lanctôt, K. L. (2010). A meta-analysis of cytokines in major depression. *Biological psychiatry*, 67(5), 446–457. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2009.09.033>
- Draper, H. H., & Hadley, M. (1990). Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods in enzymology*, 186, 421-431. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(90\)86135-i](https://doi.org/10.1016/0076-6879(90)86135-i)
- Duman R. S. (2018). Ketamine and rapid-acting antidepressants: a new era in the battle against depression and suicide. *F1000Research*, 7, F1000 Faculty Rev-659.
- Duman, R. S., Aghajanian, G. K., Sanacora, G., & Krystal, J. H. (2016). Synaptic plasticity and depression: new insights from stress and rapid-acting antidepressants. *Nature medicine*, 22(3), 238-249.
- Duman, R. S., Deyama, S., & Fogaça, M. V. (2021). Role of BDNF in the pathophysiology and treatment of depression: Activity-dependent effects distinguish rapid-acting antidepressants. *The European journal of neuroscience*, 53(1), 126-139. <https://doi.org/10.1111/ejn.14630>
- Dunham, N. W., & Miya, T. S. (1957). A note on a simple apparatus for detecting neurological deficit in rats and mice. *Journal of the American Pharmaceutical Association. American Pharmaceutical Association*, 46(3), 208-209. <https://doi.org/10.1002/jps.3030460322>
- Dunlop, B. W., & Nemeroff, C. B. (2007). The role of dopamine in the pathophysiology of depression. *Archives of general psychiatry*, 64(3), 327-337. <https://doi.org/10.1001/archpsyc.64.3.327>
- ECHA. 2021. Helsinki (Finland): European Chemicals Agency. Acessado em 11 de março de 2023. <https://echa.europa.eu/es/brief-profile/-/briefprofile/100.002.355>
- Erjavec, G.N.; Sagud, M.; Perkovic, M.N.; Strac, D.S.; Konjevod, M.; Tudor, L.; Uzun, S.; Pivac, N. (2020). Depression: Biological markers and treatment. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*105, 110139. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.202>

- Fajemiroye, J. O., da Silva, D. M., de Oliveira, D. R., & Costa, E. A. (2016). Treatment of anxiety and depression: medicinal plants in retrospect. *Fundamental & clinical pharmacology*, 30(3), 198-215. <https://doi.org/10.1111/fcp.12186>
- Falade, J., Onaolapo, A. Y., & Onaolapo, O. J. (2021). Evaluation of the Behavioural, Antioxidative and Histomorphological Effects of Folic Acid-supplemented Diet in Dexamethasone-induced Depression in Mice. *Central nervous system agents in medicinal chemistry*, 21(1), 73-81. <https://doi.org/10.2174/1871524921666210114125355>
- Fasipe, O. J. (2019). Moving from the old monoaminergic theory toward the emerging hypothesis in the rational design of rapid-onset novel antidepressants. *Medical Journal of Dr. DY Patil Vidyapeeth*, 12(4), 292. https://doi.org/10.4103/mjdrdypu.mjdrdypu_110_18
- Fathy, M., Fawzy, M. A., Hintzsche, H., Nikaido, T., Dandekar, T., & Othman, E. M. (2019). Eugenol Exerts Apoptotic Effect and Modulates the Sensitivity of HeLa Cells to Cisplatin and Radiation. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 24(21), 3979. <https://doi.org/10.3390/molecules24213979>
- Fekadu, N., Shibeshi, W. & Engidawork, E. (2017). Major depressive disorder: pathophysiology and clinical management. *J Depress Anxiety*, 6(1), 255-257. <https://doi.org/10.4172/2167-1044.1000255>
- Fonsêca, D. V. da (2016). *O orto-eugenol apresenta atividade antinoceptiva e anti-inflamatória em camundongos*. Tese de doutorado. Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB, Brasil.
- Fonsêca, D. V., Salgado, P. R., Aragão Neto, H., Golzio, A. M., Caldas Filho, M. R., Melo, C. G., Leite, F. C., Piuvezam, M. R., Pordeus, L. C., Barbosa Filho, J. M., & Almeida, R. N. (2016). Ortho-eugenol exhibits anti-nociceptive and anti-inflammatory activities. *International immunopharmacology*, 38, 402-408. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2016.06.005>
- Fonseca, E. C. M., Ferreira, L. R., Figueiredo, P. L. B., Maia, C. D. S. F., Setzer, W. N., & Da Silva, J. K. R. (2023). Antidepressant Effects of Essential Oils: A Review of the Past Decade (2012-2022) and Molecular Docking Study of Their Major Chemical Components. *International journal of molecular sciences*, 24(11), 9244. <https://doi.org/10.3390/ijms24119244>

- Fraga, D. B., Camargo, A., Olescowicz, G., Azevedo Padilha, D., Mina, F., Budni, J., Brocardo, P. S., & Rodrigues, A. (2021). A single administration of ascorbic acid rapidly reverses depressive-like behavior and hippocampal synaptic dysfunction induced by corticosterone in mice. *Chemico-biological interactions*, 342, 109476.
<https://doi.org/10.1016/j.cbi.2021.109476>
- Fraser, C. M., & Chapple, C. (2011). The phenylpropanoid pathway in Arabidopsis. *The arabidopsis book*, 9, e0152. <https://doi.org/10.1199/tab.0152>
- Gaynes, B., Warden, D., Trivedi, M. H., Wisniewski, S.R., Fava, M., & Rush, A. (2009). What did STAR*D teach us? Results from a large-scale, practical, clinical trial for patients with depression. *Psychiatric Services*, 60, 1439-1445.
<https://doi.org/10.1176/ps.2009.60.11.1439>
- Gerhard, D. M., & Duman, R. S. (2018). Rapid-Acting Antidepressants: Mechanistic Insights and Future Directions. *Current behavioral neuroscience reports*, 5(1), 36-47.
- Ghasemi M. (2019). Nitric oxide: Antidepressant mechanisms and inflammation. *Advances in pharmacology (San Diego, Calif.)*, 86, 121-152.
<https://doi.org/10.1016/bs.apha.2019.04.004>
- Girish, C., Raj, V., Arya, J., & Balakrishnan, S. (2012). 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*, 682(1-3), 118-125.
<https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2012.02.034>
- Głombik, K., Kukla-Bartoszek, M., Curzytek, K., Detka, J., Basta-Kaim, A., & Budziszewska, B. (2023). The Effects of Prenatal Dexamethasone Exposure on Brain Metabolic Homeostasis in Adulthood: Implications for Depression. *International journal of molecular sciences*, 24(2), 1156. <https://doi.org/10.3390/ijms24021156>
- Godfrey, K., Gardner, A. C., Kwon, S., Chea, W., & Muthukumaraswamy, S. D. (2018). Differences in excitatory and inhibitory neurotransmitter levels between depressed patients and healthy controls: A systematic review and meta-analysis. *Journal of psychiatric research*, 105, 33-44. <https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2018.08.015>
- Godoy, R., Macedo, A. B., Gervazio, K. Y., Ribeiro, L. R., Lima, J. L. F., & Salvadori, M. G. S. S. (2023). Effects of ortho-eugenol on anxiety, working memory and oxidative stress in mice. *Brazilian journal of biology = Revista brasileira de biologia*, 83, e271785. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.271785>

- Goshen, I., & Yirmiya, R. (2009). Interleukin-1 (IL-1): a central regulator of stress responses. *Frontiers in neuroendocrinology*, 30(1), 30-45.
<https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2008.10.001>
- Hakkola, J., Hukkanen, J., Turpeinen, M., & Pelkonen, O. (2020). Inhibition and induction of CYP enzymes in humans: an update. *Archives of toxicology*, 94(11), 3671-3722.
<https://doi.org/10.1007/s00204-020-02936-7>
- Halaris A. (2017). Inflammation-Associated Co-morbidity Between Depression and Cardiovascular Disease. *Current topics in behavioral neurosciences*, 31, 45–70.
https://doi.org/10.1007/7854_2016_28
- Hall, C., & Ballachey, E. L. (1932). A study of the rat's behavior in a field. A contribution to method in comparative psychology. *University of California Publications in Psychology*, 6, 1-12.
- Hamon, M., & Blier, P. (2013). Monoamine neurocircuitry in depression and strategies for new treatments. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry*, 45, 54–63. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2013.04.009>
- Hao, Y., Ge, H., Sun, M., & Gao, Y. (2019). Selecting an Appropriate Animal Model of Depression. *International journal of molecular sciences*, 20(19), 4827.
<https://doi.org/10.3390/ijms20194827>
- Hashmi, A. M., Butt, Z., & Umair, M. (2013). Is depression an inflammatory condition? A review of available evidence. *JPM. The Journal of the Pakistan Medical Association*, 63(7), 899-906.
- Hassanzadeh, S. A., Abbasi-Maleki, S., & Mousavi, Z. (2022). Anti-depressive-like effect of monoterpene *trans*-anethole via monoaminergic pathways. *Saudi journal of biological sciences*, 29(5), 3255–3261. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2022.01.060>
- Hayes, A. W., & Loomis, T. A. (1996). *Loomis's essentials of toxicology*. 4ed. Academic Press, San Diego, 1996. 282p.
- Hedayatnia, M., Asadi, Z., Zare-Feyzabadi, R., Yaghooti-Khorasani, M., Ghazizadeh, H., Ghaffarian-Zirak, R., Nosrati-Tirkani, A., Mohammadi-Bajgiran, M., Rohban, M., Sadabadi, F., Rahimi, H. R., Ghalandari, M., Ghaffari, M. S., Yousefi, A., Pouresmaeili, E., Besharatlou, M. R., Moohebaty, M., Ferns, G. A., Esmaily, H., & Ghayour-Mobarhan, M. (2020). Dyslipidemia and cardiovascular disease risk among the MASHAD study population. *Lipids in health and disease*, 19(1), 42.
<https://doi.org/10.1186/s12944-020-01204-y>

- Hei, M., Chen, P., Wang, S., Li, X., Xu, M., Zhu, X., Wang, Y., Duan, J., Huang, Y., & Zhao, S. (2019). Effects of chronic mild stress induced depression on synaptic plasticity in mouse hippocampus. *Behavioural brain research*, 365, 26–35.
<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2019.02.044>
- Hemmerich, J., & Ecker, G. F. (2020). In silico toxicology: From structure-activity relationships towards deep learning and adverse outcome pathways. *Wiley interdisciplinary reviews. Computational molecular science*, 10(4), e1475.
<https://doi.org/10.1002/wcms.1475>
- Herbet, M., Natarska-Chomicka, D., Ostrowska, M., Gawrońska-Grzywacz, M., Izdebska, M., Piątkowska-Chmiel, I., Korga, A., Wróbel, A., & Dudka, J. (2019). Edaravone presents antidepressant-like activity in corticosterone model of depression in mice with possible role of Fkbp5, Comt, Adora1 and Slc6a15 genes. *Toxicology and applied pharmacology*, 380, 114689. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2019.114689>
- Honório, K. M., Moda, T. L., & Andricopulo, A. D. (2013). Pharmacokinetic properties and in silico ADME modeling in drug discovery. *Medicinal chemistry (Sharjah (United Arab Emirates))*, 9(2), 163–176. <https://doi.org/10.2174/1573406411309020002>
- Horky, P., Skalickova, S., Smerkova, K., & Skladanka, J. (2019). Essential Oils as a Feed Additives: Pharmacokinetics and Potential Toxicity in Monogastric Animals. *Animals: an open access journal from MDPI*, 9(6), 352. <https://doi.org/10.3390/ani9060352>
- Hu, W., Zhang, Y., Wu, W., Yin, Y., Huang, D., Wang, Y., Li, W., & Li, W. (2016). Chronic glucocorticoids exposure enhances neurodegeneration in the frontal cortex and hippocampus via NLRP-1 inflammasome activation in male mice. *Brain, behavior, and immunity*, 52, 58–70. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2015.09.019>
- Inserra, A., Mastronardi, C. A., Rogers, G., Licinio, J., & Wong, M. L. (2019). Neuroimmunomodulation in Major Depressive Disorder: Focus on Caspase 1, Inducible Nitric Oxide Synthase, and Interferon-Gamma. *Molecular neurobiology*, 56(6), 4288–4305. <https://doi.org/10.1007/s12035-018-1359-3>
- Irie, Y., Itokazu, N., Anjiki, N., Ishige, A., Watanabe, K., & Keung, W. M. (2004). Eugenol exhibits antidepressant-like activity in mice and induces expression of metallothionein-III in the hippocampus. *Brain research*, 1011(2), 243–246.
<https://doi.org/10.1016/j.brainres.2004.03.040>
- Ismail, H., Amanat, M. A., Iqbal, A., & Mirza, B. (2018). Medicinal Plants: A Complementary and Alternative Antidepressant Therapy. *Current pharmaceutical design*, 24(22), 2609–2624. <https://doi.org/10.2174/1381612824666180727123950>

- Iwata, M., Ota, K. T., & Duman, R. S. (2013). The inflammasome: pathways linking psychological stress, depression, and systemic illnesses. *Brain, behavior, and immunity*, 31, 105-114. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2012.12.008>
- Jain, N. C. (1993). *Essentials of veterinary hematology*. Philadelphia: Lea and Febiger. SAN-TOS, *ECS Referências*, 407.
- Jakoby W. B. (1978). The glutathione S-transferases: a group of multifunctional detoxification proteins. *Advances in enzymology and related areas of molecular biology*, 46, 383-414. <https://doi.org/10.1002/9780470122914.ch6>
- Jeon, S. W., & Kim, Y. K. (2016). Neuroinflammation and cytokine abnormality in major depression: Cause or consequence in that illness? *World journal of psychiatry*, 6(3), 283-293. <https://doi.org/10.5498/wjp.v6.i3.283>
- Jesulola, E., Micalos, P., & Baguley, I. J. (2018). Understanding the pathophysiology of depression: From monoamines to the neurogenesis hypothesis model - are we there yet? *Behavioural brain research*, 341, 79-90. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2017.12.025>
- Jia, Y., Liu, L., Sheng, C., Cheng, Z., Cui, L., Li, M., Zhao, Y., Shi, T., Yau, T. O., Li, F., & Chen, L. (2019). Increased Serum Levels of Cortisol and Inflammatory Cytokines in People With Depression. *The Journal of nervous and mental disease*, 207(4), 271-276. <https://doi.org/10.1097/NMD.0000000000000957>
- Jiang, N., Zhang, B. Y., Dong, L. M., Lv, J. W., Lu, C., Wang, Q., Fan, L. X., Zhang, H. X., Pan, R. L., & Liu, X. M. (2018). Antidepressant effects of dammarane sapogenins in chronic unpredictable mild stress-induced depressive mice. *Phytotherapy research: PTR*, 32(6), 1023-1029. <https://doi.org/10.1002/ptr.6040>
- Joushi, S., & Salmani, M. E. (2017). Effect of eugenol on lithium-pilocarpine model of epilepsy: behavioral, histological, and molecular changes. *Iranian journal of basic medical sciences*, 20(7), 745-752. <https://doi.org/10.22038/IJBMS.2017.9004>
- Juszczyk, G., Mikulska, J., Kasperek, K., Pietrzak, D., Mrozek, W., & Herbet, M. (2021). Chronic Stress and Oxidative Stress as Common Factors of the Pathogenesis of Depression and Alzheimer's Disease: The Role of Antioxidants in Prevention and Treatment. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 10(9), 1439. <https://doi.org/10.3390/antiox10091439>
- Kasarala, G., & Tillmann, H. L. (2016). Standard liver tests. *Clinical liver disease*, 8(1), 13-18. <https://doi.org/10.1002/cld.562>

- Kato, M., Hori, H., Inoue, T., Iga, J., Iwata, M., Inagaki, T., Shinohara, K., Imai, H., Murata, A., Mishima, K. & Tajika, A. (2021). Discontinuation of antidepressants after remission with antidepressant medication in major depressive disorder: a systematic review and meta-analysis. *Molecular psychiatry*, 26(1), 118-133.
<https://doi.org/10.1038/s41380-020-0843-0>
- Kawashima, K., Araki, H., & Aihara, H. (1986). Effect of chronic administration of antidepressants on duration of immobility in rats forced to swim. *Japanese journal of pharmacology*, 40(2), 199-204. <https://doi.org/10.1254/jjp.40.199>
- Kawczak, P., Feszak, I., & Bączek, T. (2024). Ketamine, Esketamine, and Arketamine: Their Mechanisms of Action and Applications in the Treatment of Depression and Alleviation of Depressive Symptoms. *Biomedicines*, 12(10), 2283.
<https://doi.org/10.3390/biomedicines12102283>
- Keers, R., & Uher, R. (2012). Gene-environment interaction in major depression and antidepressant treatment response. *Current psychiatry reports*, 14(2), 129-137.
- Khakpai, F., Ramezanikhah, M., Valizadegan, F., & Zarrindast, M. R. (2021). Synergistic effect between imipramine and citicoline upon induction of analgesic and antidepressant effects in mice. *Neuroscience letters*, 760, 136095.
<https://doi.org/10.1016/j.neulet.2021.136095>
- Khalil, A.A.; ur Rahman, U.; Khan, M.R.; Sahar, A.; Mehmood, T.; Khan, M. (2017). Essential oil eugenol: sources, extraction techniques and nutraceutical perspectives. *RSC Advances*, 7, 32669-32681. <http://dx.doi.org/10.1039/C7RA04803C>
- Kobayashi, A., Suzuki, Y., & Sugai, S. (2020). Specificity of transaminase activities in the prediction of drug-induced hepatotoxicity. *The Journal of toxicological sciences*, 45(9), 515-537. <https://doi.org/10.2131/jts.45.515>
- Komori, T. (2017). The significance of proinflammatory cytokines and Th1/ Th2 balance in depression and action of antidepressants. *Neuropsychiatry* 7(1), 57-60.
<https://doi.org/10.4172 / Neuropsychiatry.1000180>
- Kraus, C., Kadriu, B., Lanzenberger, R., Zarate, C. A., Jr, & Kasper, S. (2019). Prognosis and improved outcomes in major depression: a review. *Translational psychiatry*, 9(1), 127.
<https://doi.org/10.1038/s41398-019-0460-3>
- Kuehner C. (2017). Why is depression more common among women than among men? *The lancet. Psychiatry*, 4(2), 146–158. [https://doi.org/10.1016/S2215-0366\(16\)30263-2](https://doi.org/10.1016/S2215-0366(16)30263-2)

- Kv, A., Madhana, R. M., Js, I. C., Lahkar, M., Sinha, S., & Naidu, V. (2018). Antidepressant activity of vorinostat is associated with amelioration of oxidative stress and inflammation in a corticosterone-induced chronic stress model in mice. *Behavioural brain research*, 344, 73–84. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2018.02.009>
- Laaziz, A., El Mostafi, H., Elhessni, A., Touil, T., Doumar, H., & Mesfioui, A. (2022). Chronic clomipramine treatment reverses depressogenic-like effects of a chronic treatment with dexamethasone in rats. *IBRO neuroscience reports*, 13, 147–155. <https://doi.org/10.1016/j.ibneur.2022.07.007>
- Lane, T., Anantpadma, M., Freundlich, J. S., Davey, R. A., Madrid, P. B., & Ekins, S. (2019). The Natural Product Eugenol Is an Inhibitor of the Ebola Virus In Vitro. *Pharmaceutical research*, 36(7), 104. <https://doi.org/10.1007/s11095-019-2629-0>
- Lange, S. C., Julien, R. M., & Fowler, G. W. (1976). Biphasic effects of imipramine in experimental models of epilepsy. *Epilepsia*, 17(2), 183-195. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1157.1976.tb03396.x>
- Lapchik, V. B. V.; Mattaraia, V. G. de M.; Ko, G. M (2017). *Cuidados e manejo de animais de laboratório* (2a. ed). Rio de Janeiro: Atheneu.
- Leuchter, A. F., Cook, I. A., Hunter, A. M., & Korb, A. S. (2009). A new paradigm for the prediction of antidepressant treatment response. *Dialogues in clinical neuroscience*, 11(4), 435-446. <https://doi.org/10.31887/DCNS.2009.11.4/afleuchter>
- Levy, M. J. F., Boulle, F., Steinbusch, H. W., van den Hove, D. L. A., Kenis, G., & Lanfumey, L. (2018). Neurotrophic factors and neuroplasticity pathways in the pathophysiology and treatment of depression. *Psychopharmacology*, 235(8), 2195-2220. <https://doi.org/10.1007/s00213-018-4950-4>
- Lewerenz, J., & Maher, P. (2015). Chronic Glutamate Toxicity in Neurodegenerative Diseases-What is the Evidence? *Frontiers in neuroscience*, 9, 469. <https://doi.org/10.3389/fnins.2015.00469>
- Li, M. M., Jiang, Z. E., Song, L. Y., Quan, Z. S., & Yu, H. L. (2017). Antidepressant and anxiolytic-like behavioral effects of erucamide, a bioactive fatty acid amide, involving the hypothalamus-pituitary-adrenal axis in mice. *Neuroscience letters*, 640, 6-12. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2016.12.072>
- Li, S. X., Zhang, J. C., Wu, J., & Hashimoto, K. (2014). Antidepressant Effects of Ketamine on Depression-like Behavior in Juvenile Mice after Neonatal Dexamethasone Exposure. *Clinical psychopharmacology and neuroscience: the official scientific journal of the Korean College of Neuropsychopharmacology*, 12(2), 124-127. <https://doi.org/10.9758/cpn.2014.12.2.124>

- Lim, D. W., Um, M. Y., Han, T., Lee, J., Kim, Y. T., Cho, S., Kim, I. H., Han, D., & Lee, C. (2018). Standardized Citrus unshiu peel extract ameliorates dexamethasone-induced neurotoxicity and depressive-like behaviors in mice. *Metabolic brain disease*, 33(6), 1877-1886. <https://doi.org/10.1007/s11011-018-0294-3>
- Liu, T., Zhong, S., Liao, X., Chen, J., He, T., Lai, S., & Jia, Y. (2015). A Meta-Analysis of Oxidative Stress Markers in Depression. *PloS one*, 10(10), e0138904. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0138904>
- Lopes, I. S., Oliveira, I., Capibaribe, V., Valentim, J. T., da Silva, D., de Souza, A. G., de Araújo, M. A., Chaves, R. C., Gutierrez, S., Barbosa Filho, J. M., Macêdo, D. S., & de Sousa, F. (2018). Riparin II ameliorates corticosterone-induced depressive-like behavior in mice: Role of antioxidant and neurotrophic mechanisms. *Neurochemistry international*, 120, 33-42. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2018.07.007>
- Löscher W. (2009). Preclinical assessment of proconvulsant drug activity and its relevance for predicting adverse events in humans. *European journal of pharmacology*, 610(1-3), 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2009.03.025>
- Loscher, W., Hönack, D., Fassbender, C. P., & Nolting, B. (1991). The role of technical, biological and pharmacological factors in the laboratory evaluation of anticonvulsant drugs. III. Pentylenetetrazole seizure models. *Epilepsy research*, 8(3), 171-189. [https://doi.org/10.1016/0920-1211\(91\)90062-k](https://doi.org/10.1016/0920-1211(91)90062-k)
- Lu, B., Nagappan, G., & Lu, Y. (2014). BDNF and synaptic plasticity, cognitive function, and dysfunction. *Handbook of experimental pharmacology*, 220, 223-250. https://doi.org/10.1007/978-3-642-45106-5_9
- Luszczki, J. J., Andres, M. M., Czuczwar, P., Cioczek-Czuczwar, A., Wojcik-Cwikla, J., Ratnaraj, N., Patsalos, P. N., & Czuczwar, S. J. (2005). Levetiracetam selectively potentiates the acute neurotoxic effects of topiramate and carbamazepine in the rotarod test in mice. *European neuropsychopharmacology: the journal of the European College of Neuropsychopharmacology*, 15(6), 609-616. <https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2005.03.005>
- Machado C. C. & Zatti R. A. (2015). Animais De Laboratório: O Camundongo. In: *Anais Simpac*, Viçosa, Brasil, .5(1), 169-176.
- Madden, J. C., Enoch, S. J., Paini, A., & Cronin, M. T. D. (2020). A Review of *In Silico* Tools as Alternatives to Animal Testing: Principles, Resources and Applications. *Alternatives to laboratory animals: ATLA*, 48(4), 146-172. <https://doi.org/10.1177/0261192920965977>

- Maes, M., Galecki, P., Chang, Y. S., & Berk, M. (2011). A review on the oxidative and nitrosative stress (O&NS) pathways in major depression and their possible contribution to the (neuro)degenerative processes in that illness. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry*, 35(3), 676-692.
<https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2010.05.004>
- Maes, M., Yirmiya, R., Norberg, J., Brene, S., Hibbeln, J., Perini, G., Kubera, M., Bob, P., Lerer, B., & Maj, M. (2009). The inflammatory & neurodegenerative (I&ND) hypothesis of depression: leads for future research and new drug developments in depression. *Metabolic brain disease*, 24(1), 27-53. <https://doi.org/10.1007/s11011-008-9118-1>
- Magalhães, C. B., Casquilho, N. V., Machado, M. N., Riva, D. R., Travassos, L. H., Leal-Cardoso, J. H., Fortunato, R. S., Faffe, D. S., & Zin, W. A. (2019). The anti-inflammatory and anti-oxidative actions of eugenol improve lipopolysaccharide-induced lung injury. *Respiratory physiology & neurobiology*, 259, 30-36.
<https://doi.org/10.1016/j.resp.2018.07.001>
- Maia, M. D. S., Mendonça-Junior, F. J. B., Rodrigues, G. C. S., Silva, A. S. D., Oliveira, N. I. P., Silva, P. R. D., Felipe, C. F. B., Gurgel, A. P. A. D., Nayariseri, A., Scotti, M. T., & Scotti, L. (2023). Virtual Screening of Different Subclasses of Lignans with Anti-cancer Potential and Based on Genetic Profile. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 28(16), 6011. <https://doi.org/10.3390/molecules28166011>
- Mao, Q. Q., Huang, Z., Zhong, X. M., Xian, Y. F., & Ip, S. P. (2014). Piperine reverses the effects of corticosterone on behavior and hippocampal BDNF expression in mice. *Neurochemistry international*, 74, 36-41. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2014.04.017>
- Martino, P. (2014). Un análisis de las estrechas relaciones entre el estrés y la depresión desde la perspectiva psiconeuroendocrinológica. El rol central del cortisol. *Cuadernos de Neuropsicología/Panamerican Journal of Neuropsychology*, 8(1), 60-75.
<https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=439643137004>
- Martins, J., & Sukumaran, B. (2018). Phytochemistry and pharmacology of anti-depressant medicinal plants: A review. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, 104, 343-365. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.05.044>
- Maya, G. C. (2013). Interpretación del hemograma automatizado: claves para una mejor utilización de la prueba. *Medicina & Laboratorio*, 19(01-02), 11-68.
<https://www.medigraphic.com/pdfs/medlab/myl-2013/myl131-2b.pdf>
- Mesripour, A., & Rakhshankhah, P. (2021). A Synbiotic Mixture Ameliorates Depressive Behavior Induced by Dexamethasone or Water Avoidance Stress in a Mouse Model. *Turkish journal of pharmaceutical sciences*, 18(1), 21-27.
<https://doi.org/10.4274/tjps.galenos.2019.71300>

- Mesripour, A., Alhimma, F., & Hajhashemi, V. (2019). The effect of vitamin B6 on dexamethasone-induced depression in mice model of despair. *Nutritional neuroscience*, 22(10), 744-749. <https://doi.org/10.1080/1028415X.2018.1442184>
- Miller, A. H., & Raison, C. L. (2016). The role of inflammation in depression: from evolutionary imperative to modern treatment target. *Nature reviews. Immunology*, 16(1), 22-34. <https://doi.org/10.1038/nri.2015.5>
- Molinaro, E. M., Caputo, L. F. G., Molinaro, E. M., Amendoeira, M. R. R. (2009). *Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde*. Rio de Janeiro: EPSJV, IOC.
- Monteiro, Á. B., Kelly de Souza Rodrigues, C., Petícia do Nascimento, E., Sales, V. D. S., de Araújo Delmondes, G., Nogueira da Costa, M. H., Pereira de Oliveira, V. A., Pereira de Moraes, L., Boligon, A. A., Barbosa, R., Martins da Costa, J. G., Alencar de Menezes, I. R., Bezerra Felipe, C. F., & Kerntopf, M. R. (2020). Anxiolytic and antidepressant-like effects of *Annona coriacea* (Mart.) and caffeic acid in mice. *Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, 136, 111049. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.111049>
- Możdżeń, E., Wąsik, A., Romańska, I., Michaluk, J., & Antkiewicz-Michaluk, L. (2017). Antidepressant-like effect of 1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline and its methyl derivative in animal models of depression. *Pharmacological reports: PR*, 69(3), 566-574. <https://doi.org/10.1016/j.pharep.2017.01.032>
- Muthubharathi, B. C., Gowripriya, T., & Balamurugan, K. (2021). Metabolomics: small molecules that matter more. *Molecular omics*, 17(2), 210-229. <https://doi.org/10.1039/d0mo00176g>
- Nabavi, S. M., Nabavi, S. F., Sureda, A., Caprioli, G., Iannarelli, R., Sokeng, A. J. T., Braid, N., Khanjani, S., Moghaddam, A. H., Atanasov, A. G., Daglia, M., & Maggi, F. (2018). The water extract of tutsan (*Hypericum androsaemum* L.) red berries exerts antidepressive-like effects and in vivo antioxidant activity in a mouse model of post-stroke depression. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, 99, 290-298. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.01.073>
- Nagababu, E., Rifkind, J. M., Boindala, S., & Nakka, L. (2010). Assessment of antioxidant activity of eugenol in vitro and in vivo. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 610, 165-180. https://doi.org/10.1007/978-1-60327-029-8_10
- Nandam, L. S., Brazel, M., Zhou, M., & Jhaveri, D. J. (2020). Cortisol and Major Depressive Disorder-Translating Findings From Humans to Animal Models and Back. *Frontiers in psychiatry*, 10, 974. <https://doi.org/10.3389/fpsyt.2019.00974>

- Nejad, M. S., Özgüneş, H., & Başaran, N. (2017). Pharmacological and Toxicological Properties of Eugenol. *Turkish journal of pharmaceutical sciences*, 14(2), 201-206.
<https://doi.org/10.4274/tjps.62207>
- Nettis, M. A., & Pariante, C. M. (2020). Is there neuroinflammation in depression? Understanding the link between the brain and the peripheral immune system in depression. *International review of neurobiology*, 152, 23–40.
<https://doi.org/10.1016/bs.irn.2019.12.004>
- Nikkheslat, N., McLaughlin, A. P., Hastings, C., Zajkowska, Z., Nettis, M. A., Mariani, N., Enache, D., Lombardo, G., Pointon, L., Cowen, P. J., Cavanagh, J., Harrison, N. A., Bullmore, E. T., NIMA Consortium, Pariante, C. M., & Mondelli, V. (2020). Childhood trauma, HPA axis activity and antidepressant response in patients with depression. *Brain, behavior, and immunity*, 87, 229-237.
<https://doi.org/10.1016/j.bbi.2019.11.024>
- Nisar, M. F., Khadim, M., Rafiq, M., Chen, J., Yang, Y., & Wan, C. C. (2021). Pharmacological Properties and Health Benefits of Eugenol: A Comprehensive Review. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2021, 2497354.
<https://doi.org/10.1155/2021/2497354>
- Norte, M. C., Cosentino, R. M., & Lazarini, C. A. (2005). Effects of methyl-eugenol administration on behavioral models related to depression and anxiety, in rats. *Phytomedicine: international journal of phytotherapy and phytopharmacology*, 12(4), 294-298.
<https://doi.org/10.1016/j.phymed.2003.12.007>
- Nwankpa, P., Ekweogu, C. N., Egwurugwu, J. N., Chukwuemeka, O. G., Etteh, C. C., Ugwuezumba, P. C., & Emengagha, F. C. (2018). Assessment of kidney function indices in male albino Wistar rats administered ethanol stem extract of *Dennettia tripetala* (pepper fruit). *Biochem Pharmacol (Los Angel)*, 7(242), 2167-0501.
- Oakes, P., Loukas, M., Oskouian, R. J., & Tubbs, R. S. (2017). The neuroanatomy of depression: A review. *Clinical anatomy (New York, N.Y.)*, 30(1), 44-49.
<https://doi.org/10.1002/ca.22781>
- OECD (2001). Test No. 423: *Acute Oral toxicity - Acute Toxic Class Method*. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals (Section 4, pp. 1-14). Paris: OECD Publishing.
<https://doi.org/10.1787/9789264071001-en>
- OECD (2008), *Test No. 407: Repeated Dose 28-day Oral Toxicity Study in Rodents*, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris,
<https://doi.org/10.1787/9789264070684-en>

- Oliveira, M. C. N., Cavalcante, I. L., de Araújo, A. N., Ferreira Dos Santos, A. M., de Menezes, R. P. B., Herrera-Acevedo, C., Ferreira de Sousa, N., de Souza Aquino, J., Barbosa-Filho, J. M., de Castro, R. D., Almeida, R. N., Scotti, L., Scotti, M. T., & Da Silva Stiebbe Salvadori, M. G. (2023). Methyleugenol Has an Antidepressant Effect in a Neuroendocrine Model: In Silico and In Vivo Evidence. *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)*, 16(10), 1408. <https://doi.org/10.3390/ph16101408>
- Parasuraman S. (2011). Toxicological screening. *Journal of pharmacology & pharmacotherapeutics*, 2(2), 74-79. <https://doi.org/10.4103/0976-500X.81895>
- Parente, M. S. R., Custódio, F. R., Cardoso, N. A., Lima, M. J. A., Melo, T. S., Linhares, M. I., Siqueira, R. M. P., Nascimento, A. Á. D., Catunda Júnior, F. E. A., & Melo, C. T. V. (2018). Antidepressant-Like Effect of *Lippia sidoides* CHAM (Verbenaceae) Essential Oil and Its Major Compound Thymol in Mice. *Scientia pharmaceutica*, 86(3), E27. <https://doi.org/10.3390/scipharm86030027>
- Pariante, C. M., & Miller, A. H. (2001). Glucocorticoid receptors in major depression: relevance to pathophysiology and treatment. *Biological psychiatry*, 49(5), 391-404. [https://doi.org/10.1016/s0006-3223\(00\)01088-x](https://doi.org/10.1016/s0006-3223(00)01088-x)
- Patel, S. S., & Udayabanu, M. (2014). Urtica dioica extract attenuates depressive like behavior and associative memory dysfunction in dexamethasone induced diabetic mice. *Metabolic brain disease*, 29(1), 121-130. <https://doi.org/10.1007/s11011-014-9480-0>
- Petty, F., Kramer, G. L., Fulton, M., Davis, L., & Rush, A. J. (1995). Stability of plasma GABA at four-year follow-up in patients with primary unipolar depression. *Biological psychiatry*, 37(11), 806-810. [https://doi.org/10.1016/0006-3223\(94\)00226-S](https://doi.org/10.1016/0006-3223(94)00226-S)
- Pinto, W. B. V. R., & Ko, G. M. (2012). Teste de rotarod: contribuições no estudo das doenças neuromusculares, das síndromes extrapiramidais e das ataxias cerebelares. *RESB-CAL* 1(2): 202-212.
- Pires Júnior, H. B., Borges, L. M. F., Sousa, L. A. D. D., Cunha, L. C., Lino Júnior, R. D. S., Melo, D. F. D. A., & Pereira, M. E. (2012). Avaliação da toxicidade aguda do extrato hexânico de frutos de *Melia azedarach* (Meliaceae) em camundongos. *Ciência Animal Brasileira*, 13(4).
- Pires, D. E., Blundell, T. L., & Ascher, D. B. (2015). pkCSM: Predicting Small-Molecule Pharmacokinetic and Toxicity Properties Using Graph-Based Signatures. *Journal of medicinal chemistry*, 58(9), 4066-4072. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5b00104>

- Pitsillou, E., Bresnehan, S. M., Kagarakis, E. A., Wijoyo, S. J., Liang, J., Hung, A., & Karagiannis, T. C. (2020). The cellular and molecular basis of major depressive disorder: towards a unified model for understanding clinical depression. *Molecular biology reports*, 47(1), 753-770. <https://doi.org/10.1007/s11033-019-05129-3>
- Pizzino, G., Irrera, N., Cucinotta, M., Pallio, G., Mannino, F., Arcoraci, V., Squadrito, F., Altavilla, D., & Bitto, A. (2017). Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2017, 8416763. <https://doi.org/10.1155/2017/8416763>
- Planchez, B., Surget, A., & Belzung, C. (2019). Animal models of major depression: drawbacks and challenges. *Journal of neural transmission (Vienna, Austria: 1996)*, 126(11), 1383-1408. <https://doi.org/10.1007/s00702-019-02084-y>
- Porsolt, R. D., Bertin, A., & Jalfre, M. (1977). Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.*, 229(2), 327-336.
- Prut, L., & Belzung, C. (2003). The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *European journal of pharmacology*, 463(1-3), 3-33. [https://doi.org/10.1016/s0014-2999\(03\)01272-x](https://doi.org/10.1016/s0014-2999(03)01272-x)
- Raabe, F. J., & Spengler, D. (2013). Epigenetic Risk Factors in PTSD and Depression. *Frontiers in psychiatry*, 4, 80. <https://doi.org/10.3389/fpsyt.2013.00080>
- Racagni, G., & Popoli, M. (2008). Cellular and molecular mechanisms in the long-term action of antidepressants. *Dialogues in clinical neuroscience*, 10(4), 385-400. <https://doi.org/10.31887/DCNS.2008.10.4/gracagni>
- Ragguett, R., Tamura, J., & McIntyre, R. (2019). Keeping up with the clinical advances: Depression. *CNS Spectrums*, 24(S1), 25-37. doi:10.1017/S1092852919001159
- Rahman, M. R., Ali, M., Sharif, M. & Tajmin, A. (2017). A review study on the traditional plants has potential antidepressant property. *MOJ Cell Science Report* 4(5), 138-145: <https://doi.org/00100.10.15406/mojcsr.2017.04.00100>
- Rates S. M. (2001). Plants as source of drugs. *Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology*, 39(5), 603-613. [https://doi.org/10.1016/s0041-0101\(00\)00154-9](https://doi.org/10.1016/s0041-0101(00)00154-9)
- Reddy-Thootkur, M., Kraguljac, N. V., & Lahti, A. C. (2020). The role of glutamate and GABA in cognitive dysfunction in schizophrenia and mood disorders - A systematic review of magnetic resonance spectroscopy studies. *Schizophrenia research*, S0920-9964(20)30077-3. Advance online publication. <https://doi.org/10.1016/j.schres.2020.02.001>

- Riederer, P., Lachenmayer, L., & Laux, G. (2004). Clinical applications of MAO-inhibitors. *Current medicinal chemistry*, 11(15), 2033-2043.
<https://doi.org/10.2174/0929867043364775>
- Ruksee, N., Tongjaroenbuangam, W., Mahanam, T., & Govitrapong, P. (2014). Melatonin pretreatment prevented the effect of dexamethasone negative alterations on behavior and hippocampal neurogenesis in the mouse brain. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 143, 72-80. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2014.02.011>
- Sandor, N. T., Brassai, A., Puskas, A., & Lendvai, B. (1995). Role of nitric oxide in modulating neurotransmitter release from rat striatum. *Brain research bulletin*, 36(5), 483-486. [https://doi.org/10.1016/0361-9230\(94\)00229-t](https://doi.org/10.1016/0361-9230(94)00229-t)
- Santarsieri, D., & Schwartz, T. L. (2015). Antidepressant efficacy and side-effect burden: a quick guide for clinicians. *Drugs in context*, 4, 212290.
<https://doi.org/10.7573/dic.212290>
- Santomauro, D. F., Herrera, A. M. M., Shadid, J., Zheng, P., Ashbaugh, C., Pigott, D. M., ... & Ferrari, A. J. (2021). Global prevalence and burden of depressive and anxiety disorders in 204 countries and territories in 2020 due to the COVID-19 pandemic. *The Lancet*, 398(10312), 1700-1712.
- Schiavone, S., Jaquet, V., Trabace, L., & Krause, K. H. (2013). Severe life stress and oxidative stress in the brain: from animal models to human pathology. *Antioxidants & redox signaling*, 18(12), 1475-1490. <https://doi.org/10.1089/ars.2012.4720>
- Schloss, P., & Henn, F. A. (2004). New insights into the mechanisms of antidepressant therapy. *Pharmacology & therapeutics*, 102(1), 47-60.
<https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2004.02.001>
- Sedlak, J., & Lindsay, R. H. (1968). Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Analytical biochemistry*, 25(1), 192-205. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(68\)90092-4](https://doi.org/10.1016/0003-2697(68)90092-4)
- Segal, D. S., Kuczenski, R., & Mandell, A. J. (1974). 45. *Biological psychiatry*, 9(2), 147-159.
- Sell, A. B., & Carlini, E. A. (1976). Anesthetic action of methyleugenol and other eugenol derivatives. *Pharmacology*, 14(4), 367-377. <https://doi.org/10.1159/000136617>
- Shadrina, M., Bondarenko, E. A., & Slominsky, P. A. (2018). Genetics Factors in Major Depression Disease. *Frontiers in psychiatry*, 9, 334.
<https://doi.org/10.3389/fpsyt.2018.00334>
- Shakya, A. K. (2016). Medicinal plants: Future source of new drugs. *International journal of herbal medicine*, 4(4), 59-64. 10.13140/RG.2.1.1395.6085

- Sharp T. (2013). Molecular and cellular mechanisms of antidepressant action. *Current topics in behavioral neurosciences*, 14, 309-325. https://doi.org/10.1007/7854_2012_216
- Shuster, A. L., Rocha, F. E., Wayszceyk, S., de Lima, D. D., Barauna, S. C., Lopes, B. G., Alberton, M. D., & Magro, D. D. D. (2022). Protective effect of *Myrcia pubipetala* Miq. against the alterations in oxidative stress parameters in an animal model of depression induced by corticosterone. *Brain research*, 1774, 147725. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2021.147725>
- Silva, L. C. C. P. Da, Chumbinho, L. C., Pizzini, C. C., Batista, W. S., Oliveira, F. S. De, & Oliveira, G. M. De. (2012). O uso de animais de laboratório como modelos experimentais para o estudo de transtornos psiquiátricos. *Revista da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório*, 1(3), 270-278. <http://revistas.bvs-vet.org.br/RESBCAL/article/view/3127>
- Silva, P., de Almeida, M., Silva, J., Albino, S., Espírito-Santo, R., Lima, M., Villarreal, C., Moura, R., & Santos, V. (2020). (E)-2-Cyano-3-(1*H*-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*, 21(7), 2591. <https://doi.org/10.3390/ijms21072591>
- Skupio, U., Tertilt, M., Sikora, M., Golda, S., Wawrzczak-Bargiela, A., & Przewlocki, R. (2015). Behavioral and molecular alterations in mice resulting from chronic treatment with dexamethasone: relevance to depression. *Neuroscience*, 286, 141-150. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2014.11.035>
- Sotiropoulos, I., Cerqueira, J. J., Catania, C., Takashima, A., Sousa, N., & Almeida, O. F. (2008). Stress and glucocorticoid footprints in the brain-the path from depression to Alzheimer's disease. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, 32(6), 1161-1173. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2008.05.007>
- Stahl S. M. (1998). Basic psychopharmacology of antidepressants, part 1: Antidepressants have seven distinct mechanisms of action. *The Journal of clinical psychiatry*, 59 Suppl 4, 5-14.
- Stéru, L., Chermat, R., Thierry, B., & Simon, P. (1985). The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. *Psychopharmacology*, 85(3), 367-370.
- Stevens, K. R., & Mylecraine, L. (1994). Issues in chronic toxicology. *Principles and methods of toxicology*, 673.

- Strawbridge, R., Arnone, D., Danese, A., Papadopoulos, A., Herane Vives, A., & Cleare, A. J. (2015). Inflammation and clinical response to treatment in depression: A meta-analysis. *European neuropsychopharmacology: the journal of the European College of Neuropsychopharmacology*, 25(10), 1532-1543. <https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2015.06.007>
- Tao, G., Irie, Y., Li, D. J., & Keung, W. M. (2005). Eugenol and its structural analogs inhibit monoamine oxidase A and exhibit antidepressant-like activity. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 13(15), 4777-4788. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2005.04.081>
- Taquet, M., Holmes, E. A., & Harrison, P. J. (2021). Depression and anxiety disorders during the COVID-19 pandemic: knowns and unknowns. *The Lancet*, 398(10312), 1665-1666. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)02221-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)02221-2)
- Tomaz, V. S., Chaves Filho, A., Cordeiro, R. C., Jucá, P. M., Soares, M., Barroso, P. N., Cristino, L., Jiang, W., Teixeira, A. L., de Lucena, D. F., & Macedo, D. S. (2020). Antidepressants of different classes cause distinct behavioral and brain pro and anti-inflammatory changes in mice submitted to an inflammatory model of depression. *Journal of affective disorders*, 268, 188–200. <https://doi.org/10.1016/j.jad.2020.03.022>
- Vasilopoulou, C. G., Margarity, M., & Klapa, M. I. (2016). Metabolomic Analysis in Brain Research: Opportunities and Challenges. *Frontiers in physiology*, 7, 183. <https://doi.org/10.3389/fphys.2016.00183>
- Wang, C., Gan, D., Wu, J., Liao, M., Liao, X., & Ai, W. (2018). Honokiol Exerts Antidepressant Effects in Rats Exposed to Chronic Unpredictable Mild Stress by Regulating Brain Derived Neurotrophic Factor Level and Hypothalamus-Pituitary-Adrenal Axis Activity. *Neurochemical research*, 43(8), 1519-1528. <https://doi.org/10.1007/s11064-018-2566-z>
- Wang, S., Tang, S., Huang, J., & Chen, H. (2022). Rapid-acting antidepressants targeting modulation of the glutamatergic system: clinical and preclinical evidence and mechanisms. *General Psychiatry*, 35(6). <http://dx.doi.org/10.1136/gpsych-2022-100922>
- Wang, Y. J., Liu, L., Wang, Y., Wang, J. L., Gao, T. T., Wang, H., Chen, T. T., Guan, W., & Jiang, B. (2020). Imipramine exerts antidepressant-like effects in chronic stress models of depression by promoting CRT1 expression in the mPFC. *Brain research bulletin*, 164, 257-268. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2020.08.028>
- Watt, D. F., & Panksepp, J. (2009). Depression: An evolutionarily conserved mechanism to terminate separation distress? A review of aminergic, peptidergic, and neural network perspectives. *Neuropsychopharmacology*, 11(1), 7-51. <https://doi.org/10.1080/15294145.2009.10773593>

- Wigmore, E. M., Hafferty, J. D., Hall, L. S., Howard, D. M., Clarke, T. K., Fabbri, C., Lewis, C. M., Uher, R., Navrady, L. B., Adams, M. J., Zeng, Y., Campbell, A., Gibson, J., Thomson, P. A., Hayward, C., Smith, B. H., Hocking, L. J., Padmanabhan, S., Deary, I. J., Porteous, D. J., ... McIntosh, A. M. (2020). Genome-wide association study of antidepressant treatment resistance in a population-based cohort using health service prescription data and meta-analysis with GENDEP. *The pharmacogenomics journal*, 20(2), 329-341. <https://doi.org/10.1038/s41397-019-0067-3>
- Witkin, J. M., Martin, A. E., Golani, L. K., Xu, N. Z., & Smith, J. L. (2019). Rapid-acting antidepressants. *Advances in Pharmacology*, 86, 47-96. <https://doi.org/10.1016/bs.apha.2019.03.002>
- World Health Organization (2017). *Depression and other common mental disorders: global health estimates*. World Health Organization. License: CC BY-NC-SA 3.0 IGO, World Health Org., Geneva. <https://www.who.int/publications/i/item/depression-global-health-estimates>
- Wróbel, A., Serefko, A., Wlaź, P., & Poleszak, E. (2014). The depressogenic-like effect of acute and chronic treatment with dexamethasone and its influence on the activity of antidepressant drugs in the forced swim test in adult mice. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry*, 54, 243-248. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2014.06.008>
- Wróbel, A., Serefko, A., Wlaź, P., & Poleszak, E. (2015). The effect of imipramine, ketamine, and zinc in the mouse model of depression. *Metabolic brain disease*, 30(6), 1379-1386. <https://doi.org/10.1007/s11011-015-9709-6>
- Wu, J., Li, J., Gaurav, C., Muhammad, U., Chen, Y., Li, X., Chen, J., & Wang, Z. (2021). CUMS and dexamethasone induce depression-like phenotypes in mice by differentially altering gut microbiota and triggering macroglia activation. *General psychiatry*, 34(6), e100529. <https://doi.org/10.1136/gpsych-2021-100529>
- Wu, L., Niu, Z., Hu, X., Liu, H., Li, S., Chen, L., Zheng, D., Liu, Z., Liu, T., Xu, F., Manyande, A., Wang, J., & Xia, H. (2020). Regional cerebral metabolic levels and turnover in awake rats after acute or chronic spinal cord injury. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 34(8), 10547-10559. <https://doi.org/10.1096/fj.202000447R>
- Xu, J., Wang, R., Liu, Y., Wang, W., Liu, D., Jiang, H., & Pan, F. (2019). Short- and long-term alterations of FKBP5-GR and specific microRNAs in the prefrontal cortex and hippocampus of male rats induced by adolescent stress contribute to depression susceptibility. *Psychoneuroendocrinology*, 101, 204-215. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2018.11.008>

- Yakubu, M. T., Bilbis, L. S., Lawal, M., & Akanji, M. A. (2003). Evaluation of selected parameters of rat liver and kidney function following repeated administration of yohimbine. *Biokemistri*, 15(2), 50-56.
<https://www.ajol.info/index.php/biokem/article/view/136133>
- Young, S. N., & Leyton, M. (2002). The role of serotonin in human mood and social interaction. Insight from altered tryptophan levels. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*, 71(4), 857–865. [https://doi.org/10.1016/s0091-3057\(01\)00670-0](https://doi.org/10.1016/s0091-3057(01)00670-0)
- Zhang, J. Q., Wu, X. H., Feng, Y., Xie, X. F., Fan, Y. H., Yan, S., Zhao, Q. Y., Peng, C., & You, Z. L. (2016). Salvianolic acid B ameliorates depressive-like behaviors in chronic mild stress-treated mice: involvement of the neuroinflammatory pathway. *Acta pharmacologica Sinica*, 37(9), 1141-1153. <https://doi.org/10.1038/aps.2016.63>
- Zhao, X., Wang, C., Zhang, J. F., Liu, L., Liu, A. M., Ma, Q., Zhou, W. H., & Xu, Y. (2014). Chronic curcumin treatment normalizes depression-like behaviors in mice with mononeuropathy: involvement of supraspinal serotonergic system and GABAA receptor. *Psychopharmacology*, 231(10), 2171-2187. <https://doi.org/10.1007/s00213-013-3368-2>
- Zhao, Y., Wang, Q., Wu, X., Jiang, M., Jin, H., Tao, K., & Hou, T. (2021). Unraveling the polypharmacology of a natural antifungal product, eugenol, against *Rhizoctonia solani*. *Pest management science*, 77(7), 3469-3483. <https://doi.org/10.1002/ps.6400>
- Zhao, Y., Yang, G., Zhao, Z., Wang, C., Duan, C., Gao, L., & Li, S. (2020). Antidepressant-like effects of *Lactobacillus plantarum* DP189 in a corticosterone-induced rat model of chronic stress. *Behavioural brain research*, 395, 112853.
<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2020.112853>
- Zou, W., Feng, R., & Yang, Y. (2018). Changes in the serum levels of inflammatory cytokines in antidepressant drug-naïve patients with major depression. *PloS one*, 13(6), e0197267. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0197267>

ANEXO A – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA



Universidade
Federal da
Paraíba

Comissão de Ética no
Uso de Animais



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIDEPRESSIVA-SÍMILE DO ORTO-EUGENOL EM CAMUNDONGOS", protocolada sob o CEUA nº 5029280422 (ID 001619), sob a responsabilidade de **Mirian G. S. Stiebbe Salvadori** e equipe; *Antonia Fernandes Furtado de Abrantes* - 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 13/05/2022.

We certify that the proposal "RESEARCH OF ORTHO-EUGENOL ANTIDEPRESSIVE-LIKE ACTIVITY IN MICE", utilizing 390 Heterogenics mice (males and females), protocol number CEUA 5029280422 (ID 001619), under the responsibility of **Mirian G. S. Stiebbe Salvadori** and team; *Antonia Fernandes Furtado de Abrantes* - 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 05/13/2022.

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

Vigência da Proposta: de **07/2022 a 06/2025**

Área: **Psicologia**

Origem: **Centro de Bioterismo da Universidade Estadual da Paraíba**

Espécie: **Camundongos heterogênicos**

sexo: **Fêmeas**

idade: **6 a 8 semanas**

N: **150**

Linhagem: **Mus musculus - Swiss**

Peso: **20 a 30 g**

Origem: **Labetox**

Espécie: **Camundongos heterogênicos**

sexo: **Machos e Fêmeas**

idade: **6 a 8 semanas**

N: **240**

Linhagem: **Mus musculus - Swiss**

Peso: **20 a 30 g**

Local do experimento: Os experimentos serão realizados no Laboratório de Psicofarmacologia da Universidade Federal da Paraíba (UFPB), mas também contará com a contribuição do Laboratório de Ensaios Toxicológicas não clínicos e clínicos (LABETOX) nos testes bioquímicos e hematológicos, no NUCAL - Núcleo de Caracterização e Análise da Universidade Federal da Paraíba onde serão feitos a quantificação de neurotransmissores, seus metabólitos e hormônios.

João Pessoa, 13 de maio de 2022

Profa. Dra. Adriana Maria Fernandes de Oliveira Golzio
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal da Paraíba

Prof. Dr. Ivia Carmem Talieri
Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal da Paraíba

ANEXO B – PROTOCOLO EXPERIMENTAL DA TRIAGEM FARMACOLÓGICA COMPORTAMENTAL

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

Fonte: Almeida (2006).