

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS**

Roberto Ferreira Vieira

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIDEPRESSIVO DE
DERIVADOS SEMISSINTÉTICOS DA ESCOPOLETINA
OBTIDA DA *Polygala sabulosa***

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Neurociências
da Universidade Federal de Santa
Catarina para a obtenção do Grau de
Mestre em Neurociências.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Lúcia Severo Rodrigues

**Florianópolis
2011**

Catálogo na fonte pela Biblioteca Universitária
da
Universidade Federal de Santa Catarina

V657a Vieira, Roberto Ferreira
Avaliação do potencial antidepressivo de derivados
semissintéticos da escopoletina obtida da Polygala sabulosa
[dissertação] / Roberto Ferreira Vieira ; orientadora, Ana
Lúcia Severo Rodrigues. - Florianópolis, SC, 2011.
1 v.: il., grafs., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-
Graduação em Neurociências.

Inclui referências

1. Neurociências. 2. Antidepressivos. 3. Escopoletina.
4. Polygala sabulosa. 5. Suspensão - (Química) - Testes.
I. Rodrigues, Ana Lucia Severo. II. Universidade Federal
de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Neurociências.
III. Título.

CDU 612.82

*Dedico esta Dissertação à minha
amada mãe Antonia Ferreira Vieira,
pois tenho a certeza de que onde ela
estiver neste momento, estará
compartilhando da mesma felicidade
que estou sentindo!*

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter-me permitido alcançar este objetivo.

À Márcia minha namorada, pela companhia, pelo apoio, pela compreensão e pelo amor. Fostes o meu suporte emocional, te amo!

À minha família por se preocupar e desejar que eu seja feliz!

Às minhas irmãs Dasa, Mariane e Norma pelos exemplos de amor e solidariedade.

À minha orientadora Ana Lúcia por ter-me aceito como orientando, pela sua capacidade intelectual, por me oportunizar o convívio no meio científico, pelas orientações e ensinamentos, pelos diálogos informais e pela amizade. Serei eternamente grato! Muito obrigado!

Ao professor Pizzolatti pela colaboração, pelos ensinamentos, pelos trabalhos na síntese dos derivados e por me receber, sempre, com muita atenção e entusiasmo! Meus sinceros agradecimentos!

À Josi, sem a qual este trabalho não teria sido realizado, pela ajuda em todas as etapas do mestrado, pela disposição, pelo comprometimento e pelo otimismo. “Josi que tem o dom de transformar dificuldades em soluções e que tem a capacidade e a habilidade de congregar diversas pessoas e grupos.” Um exemplo de força! Muito obrigado pela amizade e apoio!

Ao Leandro Espíndola pela atenção e colaboração nos diálogos que envolviam a interface entre a química e a biologia e pelos trabalhos na síntese dos derivados. Muito obrigado!

Ao Maurício, pelo apoio, amizade e pela grande ajuda nos experimentos, no artigo, na dissertação e nas sugestões apropriados nas apresentações da qualificação e da defesa deste trabalho. Muito obrigado mesmo!

À Dani pela participação nos primeiros experimentos, pelas contribuições na escrita do projeto e do artigo, pelas conversas informais, pelas palavras de apoio e pelos cafezinhos! Muito obrigado!

Ao Ricardo e à Kelly pela ajuda nos estudos para a seleção do mestrado, pelas orientações dos primeiros seminários e pelo convívio e amizade! Muito obrigado!

À Agatha, ao Francis, à Sinara, à Camila e à Mari pela ajuda nos experimentos e pela amizade! Muito obrigado!

Aos meus amigos de laboratório: Jardel, Juliano, Cris, Vívian, Grasi, Luis, Morgana, Daniel, André, Andiará, Andréa e Dai pelo convívio no laboratório e por contribuir com um ambiente rico em diálogos e colaborações!

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Neurociências pelos ensinamentos e pela amizade. Meus sinceros e eternos agradecimentos!

A todos os meus colegas e amigos do Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Bioquímica pelo agradável convívio!

Ao Douglas, à Marise, ao Gilberto, à Rosângela e a todos os meus irmãos(ãs) do grupo de orações! Vocês são a extensão da minha família!

Ao Nivaldo pela amizade, pelo profissionalismo e pelo tratamento atencioso que sempre tive! Muito obrigado!

Aos animais de laboratório pela imensa contribuição e importância para a pesquisa científica! Meus sinceros e eternos agradecimentos!

À CAPES pelo apoio financeiro, fundamental, durante o período de dedicação exclusiva ao mestrado!

RESUMO

O nosso grupo demonstrou recentemente que a escopoletina, uma cumarina obtida de *Polygala sabulosa* exerce efeito tipo-antidepressivo no teste da suspensão pela cauda (TSC) em camundongos. Neste estudo foi investigado o possível efeito antidepressivo de derivados semissintéticos da escopoletina: octanoato de escopoletina (10^{-2} – 10 mg/kg, p.o.), p-clorobenzoato de escopoletina (10^{-2} – 10^2 mg/kg, p.o.), p-metillbenzoato de escopoletina (10^{-2} – 10 mg/kg, p.o.) e p-bromobenzoato de escopoletina (10^{-6} – 10 mg/kg, p.o.) no TSC. O octanoato de escopoletina (10^{-1} – 1 mg/kg, p.o.), p-clorobenzoato de escopoletina (10^{-1} – 10 mg/kg, p.o.), p-metillbenzoato de escopoletina (1– 10 mg/kg, p.o.) e p-bromobenzoato de escopoletina (10^{-5} – 10 mg/kg, p.o.) reduziram o tempo de imobilidade no TSC, sem produzir efeito psicoestimulante no teste do campo aberto. O p-bromobenzoato de escopoletina foi o derivado que apresentou a maior potência no TSC. O pré-tratamento de camundongos com o inibidor da síntese de serotonina PCPA (100 mg/kg, i.p., uma vez por dia, durante 4 dias consecutivos) preveniu a diminuição do tempo de imobilidade induzida pelo p-bromobenzoato de escopoletina (10^{-2} mg/kg, p.o.). Neste trabalho, os potenciais efeitos sinérgicos advindos da administração de doses sub-efetivas de inibidores seletivos do recaptção de serotonina (fluoxetina, sertralina e paroxetina) e uma dose sub-efetiva de p-bromobenzoato de escopoletina também foram investigados. A administração de uma dose sub-efetiva de p-bromobenzoato de escopoletina (10^{-6} mg/kg, p.o.) potencializou o efeito antidepressivo de doses sub-efetivas de fluoxetina (5 mg/kg, p.o.), sertralina (0,3 mg/kg, p.o.) e paroxetina (0,1 mg/kg, p.o.) no TSC. Os resultados indicam que o efeito tipo-antidepressivo do p-bromobenzoato de escopoletina é dependente do sistema serotoninérgico. Portanto, os presentes dados são promissores e requerem estudos complementares que avaliem a relevância terapêutica do p-bromobenzoato de escopoletina isoladamente e/ou em combinação com os inibidores seletivos da recaptção de serotonina no tratamento da depressão.

Palavras-chave: Antidepressivos, Derivados semi-sintéticos, p-Bromobenzoato de escopoletina, Sistema serotoninérgico, Teste de suspensão pela cauda.

ABSTRACT

Our group has recently demonstrated that scopoletin, a coumarin obtained from *Polygala sabulosa*, exerts antidepressant-like effect in the tail suspension test (TST) in mice. In this study, we investigated the possible antidepressant-like effect of semi-synthetic derivatives of scopoletin obtained from *Polygala sabulosa* in the TST. Moreover, the effects of the semi-synthetic derivatives of scopoletin octanoylscoipoletin (10^{-2} – 10 mg/kg, p.o.), 4-chlorobenzoylscoipoletin (10^{-2} – 10^2 mg/kg, p.o.), 4-methylbenzoylscoipoletin (10^{-2} – 10 mg/kg, p.o.) and 4-bromobenzoylscoipoletin (10^{-6} – 10 mg/kg, p.o.) in the TST were evaluated. Octanoylscoipoletin (10^{-1} – 1 mg/kg, p.o.), 4-chlorobenzoylscoipoletin (10^{-1} – 10 mg/kg, p.o.), 4-methylbenzoylscoipoletin (1–10 mg/kg, p.o.) and 4-bromobenzoylscoipoletin (10^{-5} – 10 mg/kg, p.o.) significantly reduced the immobility time in the TST without changing the locomotor activity in the open-field test. Our data indicated that p-bromobenzoylscoipoletin produced the greatest potency in the TSC. Pretreatment of mice with PCPA, an inhibitor of serotonin synthesis, (100 mg/kg, i.p., once a day for 4 consecutive days) significantly prevented the decrease in the immobility time elicited by 4-bromobenzoylscoipoletin (10^{-2} mg/kg, p.o.). Moreover, in this work the potential synergistic effects of the administration of sub-effective doses of selective serotonin reuptake inhibitors (fluoxetine, sertraline, paroxetine) and a sub-effective dose of 4-bromobenzoylscoipoletin were also investigated. Administration of a sub-effective dose of 4-bromobenzoylscoipoletin (10^{-6} mg/kg, p.o.) potentiated the antidepressant-like effect of a sub-effective doses of fluoxetine (5 mg/kg, p.o.), sertraline (0.3 mg/kg, p.o.) and paroxetine (0.1 mg/kg, p.o.) in the TST. The results indicate that the antidepressant-like effect of 4-bromobenzoylscoipoletin is dependent on the serotonergic system. Therefore, the present findings warrant further studies to evaluate the therapeutic relevance of 4-bromobenzoylscoipoletin alone or in combination with selective serotonin re-uptake inhibitors for the treatment of depression.

Keywords: Antidepressants, Semi-synthetic derivatives of scopoletin, 4-Bromobenzoilescopoletin, Serotonergic system, Tail suspension test.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. <i>Polygala sabulosa</i> (Polygalaceae).....	32
Figura 2. Ilustração da <i>Polygala sabulosa</i>	32
Figura 3. Fórmula estrutural da escopoletina.....	33
Figura 4. Esquema dos procedimentos gerais para obtenção de princípios ativos de plantas frações e compostos puros, modificações estruturais e screenings biológicos.....	35
Figura 5. Estrutura química da escopoletina e dos DSEs	36
Figura 6. Reação de hidrólise ácida da preniloxicumarina.....	45
Figura 7. Síntese do octanoato de escopoletina.....	46
Figura 8. Síntese do p-clorobenzoato de escopoletina.....	46
Figura 9. Síntese do p-bromobenzoato de escopoletina.....	47
Figura 10. Síntese do p-metilbenzoato de escopoletina.....	47
Figura 11. Teste da suspensão pela cauda (TSC).....	48
Figura 12. Teste do campo aberto (TCA).....	49
Figura 13. Esquema da curva de doses crescentes de DSEs no TSC e TCA.....	49
Figura 14. Esquema da curva de doses crescentes do DSE de maior potência (p-bromobenzoato de escopoletina) no TSC e TCA.....	50
Figura 15. Esquema utilizado para elaboração da curva tempo-resposta do p-bromobenzoato de escopoletina quando administrado por via p.o no TSC.....	50
Figura 16. Esquema representativo da investigação do mecanismo de ação serotoninérgico do DSE de maior potência (p-bromobenzoato de escopoletina).....	51
Figura 17. Esquema da interação do DSE de maior potência (p-bromobenzoato de escopoletina) e antidepressivos convencionais ISRS no TSC e no TCA.....	51
Figura 18. Efeito do tratamento com DSEs ou veículo no TSC em camundongos.....	54
Figura 19. Efeito do tratamento com DSEs ou veículo no TCA em camundongos.....	55
Figura 20. Efeito do tratamento agudo por via p.o. com p-bromobenzoato de escopoletina 30, 60 ou 120 minutos antes do TSC e TCA.....	56
Figura 21. Efeito do pré-tratamento com PCPA na redução do tempo de imobilidade do p-bromobenzoato de escopoletina no TSC e no TCA em camundongos.....	57

Figura 22. Efeito do tratamento dos animais com dose sub-ativa de p-bromobenzoato de escopoletina em combinação com doses sub-ativas de antidepressivos no TSC em camundongos.....	58
Figura 23. Efeito do tratamento dos animais com dose sub-ativa de p-bromobenzoato de escopoletina em combinação com doses sub-ativas de antidepressivos no TCA em camundongos.....	59

LISTA DE QUADROS

Quadro 1- Critérios Diagnósticos da Depressão de Acordo com o DSM-IV.....	02
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS

α_1 e α_2 = subtipos de receptores noradrenérgicos
ANOVA=análise de variância
CCD= cromatografia em camada delgada
CEUA= Comissão de Ética no Uso de Animais
 D_1 e D_2 = subtipos de receptores dopaminérgicos
DSEs=derivados semissintéticos da escopoletina
EPM=erro padrão da média
5-HT_{2A/2C} = subtipos de receptores serotoninérgicos
i.c.v. = intracerebroventricular
ID50= dose capaz de inibir em 50% a resposta biológica
i.p. = intraperitoneal
ISRN= inibidores seletivos da recaptação de noradrenalina
ISRS= inibidores seletivos da recaptação de serotonina
MAO= enzima monoamina oxidase
MAO-A= enzima monoamina oxidase A
PCPA= éster metílico da p-clorofenilalanina
p.f. = ponto de fusão
p.o.= *per os* (via oral)
RNM= ressonância nuclear magnética
TCA=teste do campo aberto
TNF= teste do nado forçado
TSC= teste da suspensão pela cauda
v:v = volume:volume

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	27
1.1 DEPRESSÃO.....	27
1.1.1 Hipótese monoaminérgica da depressão	28
1.2 PLANTAS E MEDICAMENTOS.....	29
1.2.1. Família Polygalaceae	30
1.2.2 Escopoletina, um derivado de <i>Polygala sabulosa</i>	33
1.2.3 Relação estrutura química e atividade biológica	34
1.2.4 Derivados semissintéticos da escopoletina (DSEs) obtida da <i>Polygala sabulosa</i> e a relação estrutura atividade	35
1.3 MODELOS ANIMAIS.....	36
2 JUSTIFICATIVA	39
3 OBJETIVOS	41
3.1 OBJETIVO GERAL.....	41
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	41
4 MATERIAL E MÉTODOS	43
4.1 ANIMAIS.....	43
4.2 DROGAS E TRATAMENTOS.....	43
4.3 PREPARAÇÃO DOS DSEs.....	44
4.3.1 Obtenção da escopoletina a partir da preniloxicumarina	44
4.3.2 Metodologia geral para benzoilação/acilação da escopoletina	45
4.3.3 Síntese do octanoato de escopoletina	45
4.3.4 Síntese do p-clorobenzoato de escopoletina	46
4.3.5 Síntese do p-bromobenzoato de escopoletina	46
4.3.6 Síntese do p-metilbenzoato de escopoletina	47
4.4 TESTES COMPORTAMENTAIS.....	47
4.4.1 Teste da suspensão pela cauda	47
4.4.2 Teste do campo aberto	48
4.5 ANÁLISE DO MECANISMO DE AÇÃO ANTIDEPRESSIVA DO p-BROMOBENZOATO DE ESCOPOLETINA (DSE DE MAIOR POTÊNCIA NO TSC) ATRAVÉS DE ESTUDOS FARMACOLÓGICOS IN VIVO.....	49
4.5.1 Protocolo Experimental	49
4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	52
5 RESULTADOS	53

5.1 A AVALIAÇÃO DO EFEITO DE DSEs NA AÇÃO TIPO-ANTIDEPRESSIVO NO TSC E NA ATIVIDADE LOCOMOTORA NO TESTE DO CAMPO ABERTO EM CAMUNDONGOS.....	53
5.2 INVESTIGAÇÃO DO MECANISMO TIPO ANTIDEPRESSIVO DO p-BROMOBENZOATO DE ESCOPOLETINA NO TSC.....	56
5.2.1 Envolvimento do sistema serotoninérgico.....	56
5.2.2 Interação do p-bromobenzoato de escopoletina com antidepressivos convencionais no TSC.....	57
6 DISCUSSÃO.....	61
7 CONCLUSÃO.....	67
PERSPECTIVAS.....	69
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	71

1 INTRODUÇÃO

1.1 DEPRESSÃO

A depressão teve os seus primeiros relatos datados de, aproximadamente, 400 anos antes de Cristo quando Hipócrates descreveu em seu tratado, “A Natureza do Homem”, a teoria dos quatro humores corporais (sangue, fleugma ou pituíta, bílis amarela, e bílis negra), onde o desequilíbrio do humor “bílis negra” estaria associado a um estado de melancolia, única condição cujo nome original sobreviveu da classificação de Hipócrates (Wong e Licinio, 2001).

Segundo a American Psychiatric Association (1994), os transtornos de humor são alterações patológicas e episódicas no estado emocional associadas a anormalidades na cognição e no comportamento. A depressão ou transtorno depressivo maior é uma doença crônica, recorrente e potencialmente ameaçadora de vida, que afeta cerca de 20% da população mundial (Berton e Nestler, 2006). Trata-se de uma das doenças psiquiátricas mais prevalentes afetando, aproximadamente, 20 a 25% das mulheres e 10 a 17% dos homens (Kessler *et al.*, 1994; Levinson, 2006). Esta doença é reconhecida como um problema de saúde pública (Nestler e Carlezon, 2006), tanto pela sua prevalência, quanto pelo impacto que causa no cotidiano de pacientes e familiares envolvidos (Simon *et al.*, 1995). A depressão possui grandes implicações sociais, uma vez que os acometidos pela doença apresentam limitação da sua atividade e bem-estar, o que provoca incapacidade e perda de produtividade (Ebmeier *et al.*, 2006), além de uma maior utilização de serviços de saúde (Fleck *et al.*, 2003; Nemeroff, 2007). Estima-se que no Brasil existam aproximadamente 54 milhões de pessoas que em algum momento de suas vidas terão algum tipo de depressão, sendo que 7,5 milhões terão episódios agudos e graves, muitas destas com risco de suicídio (Nardi, 2000).

O diagnóstico da depressão maior é baseado em observações clínicas dos sintomas estabelecidos pelo Manual Estatístico e Diagnóstico de Doenças Mentais, quarta edição (American Psychiatry Association, DSM-IV, 2000). De acordo com este manual um indivíduo é diagnosticado com depressão maior se preencher os critérios enumerados no **Quadro 1**: apresentar pelo menos um dentre os dois primeiros sintomas e mais o número necessário para perfazer um total de cinco dentre os sintomas três a nove. No entanto, estes podem ser variáveis e por vezes contrastantes. Os sintomas devem persistir por um período mínimo de duas semanas. (American Psychiatric Association, 1994).

Quadro 1. Critérios Diagnósticos da Depressão de Acordo com o DSM-IV

- | |
|---|
| 1. Humor deprimido |
| 2. Anedonia |
| 3. Insônia ou hipersônia |
| 4. Letargia ou agitação psicomotora |
| 5. Fadiga ou falta de energia |
| 6. Diminuição da concentração |
| 7. Perda ou ganho de peso ou de apetite |
| 8. Sentimentos de desvalia ou culpa |
| 9. Pensamentos recorrentes de morte ou suicídio |

Fonte: Manual de Diagnóstico e Estatístico dos Distúrbios Mentais (American Psychiatric Association, 1994).

Associados a esses sintomas os indivíduos deprimidos podem apresentar co-morbidades com doenças arteriais coronarianas, isquemia cerebral, distúrbios metabólicos (Teng *et al.*, 2005), câncer e também com outras doenças psiquiátricas (Nemeroff e Owens, 2002; Nestler *et al.*, 2002).

1.1.1 Hipótese monoaminérgica da depressão

Em muitos casos, a depressão não tem uma causa identificável. Entretanto, existem fatores associados ao episódio depressivo. Entre estes estão: genéticos (hereditários) e ambientais ocasionando alterações fisiológicas, bioquímicas e morfológicas (File, 1996; Nestler *et al.*, 2002; Berton e Nestler 2006). Apesar da etiologia da depressão ainda não ser bem esclarecida sabe-se que a doença resulta, em parte, de uma deficiência na atividade monoaminérgica no cérebro (Elhwuegi, 2004). A hipótese monoaminérgica da depressão surgiu em 1965 e postula que esta doença pode ser consequência de uma redução dos níveis de monoaminas (serotonina, noradrenalina) na fenda sináptica e que o tratamento da depressão envolve o aumento da atividade monoaminérgica no cérebro (Schildkraut, 1965; Elhwuegi, 2004). Esta hipótese é sustentada principalmente pelo fato de a maioria dos antidepressivos utilizados na clínica aumentarem os níveis de monoaminas no cérebro (Nemeroff, 2007). Estudos neurobiológicos e

neuroanatômicos também estão de acordo com a hipótese monoaminérgica e indicam que importantes alterações nos sistemas serotoninérgico e noradrenérgico estão relacionadas com o sucesso do tratamento antidepressivo (Cummings, 1993; Elhwuegi, 2004).

Existem várias classes de antidepressivos usados para o tratamento da depressão. Estes fármacos podem agir inibindo a enzima monoamina oxidase (MAO) ou atuando sobre os sistemas de recaptação das monoaminas em conjunto como é o caso dos antidepressivos tricíclicos. Podem ainda ser inibidores seletivos da recaptação de serotonina (ISRS) ou da recaptação de noradrenalina (ISRN) aumentando a concentração destes neurotransmissores na fenda sináptica (Nemeroff e Owens, 2002; Nemeroff, 2007). No entanto, estes fármacos proporcionam uma remissão completa para apenas cerca de 50% dos indivíduos, além de causarem efeitos colaterais, o que muitas vezes contribui para diminuir a adesão dos pacientes ao tratamento (Brunello *et al.*, 2002). Além disso, a resposta terapêutica destes fármacos só ocorre 3-5 semanas após o início do tratamento. Desta forma, existe uma grande necessidade do desenvolvimento de terapias antidepressivas alternativas ou de substâncias que possam aumentar a eficácia clínica no tratamento da depressão.

1.2 PLANTAS E MEDICAMENTOS

Segundo a Organização Mundial da Saúde, cerca de 65-80% da população mundial que vive em países em desenvolvimento depende das plantas para seus cuidados primários de saúde (Akerle, 1993; Calixto, 2005). No Brasil, 84% das drogas atualmente no mercado são importadas e 60% de todas as drogas processadas são consumidas por 23% da população o que faz com que os remédios caseiros a base de plantas medicinais sejam ainda a principal fonte de medicamentos para a maioria do povo brasileiro (Elisabetsky e Wannmacher, 1993). Assim, é inegável que a maioria da população de baixa renda recorra às plantas medicinais para o tratamento dos seus males. Nesse contexto, as plantas medicinais e em especial o uso dos medicamentos fitoterápicos adquirem importância como agentes terapêuticos e, por isso, devem ser prioritariamente analisados segundo os métodos modernos disponíveis (Lapa *et al.*, 1999; Calixto, 1998, 2000). No entanto, o uso clínico de medicamentos com ação antidepressiva obtidos de plantas ainda é bastante limitado e estudos adicionais neste sentido são importantes visto que a maioria dos antidepressivos existentes no mercado, principalmente os de menor custo como os antidepressivos tricíclicos,

produzem efeitos colaterais importantes que leva, frequentemente, à diminuição da adesão dos pacientes ao tratamento (MacGillivray *et al.*, 2003). Como o interesse em terapias naturais é muito grande por parte da população, a adesão ao tratamento costuma ser maior no caso do uso de fitofármacos (Calixto, 2000). Desta forma, considerando-se o exposto e a necessidade de otimização de farmacoterapia convencional para a depressão, nosso grupo de pesquisa tem se dedicado a investigar a possível ação antidepressiva de plantas de ocorrência no Estado de Santa Catarina (Machado *et al.*, 2007, 2009; Freitas *et al.*, 2010).

1.2.1. Família Polygalaceae

Atualmente, acredita-se que a família *Polygalaceae* seja constituída por aproximadamente 1000 espécies reunidas em 16 a 18 gêneros (Furness e Stafford, 1995). As espécies pertencentes a esta família estão dispersas em todo mundo, com exceção da Nova Zelândia e das zonas árticas e antárticas sendo abundantes nos trópicos (Ludtke, 2004).

Gênero Polygala

O gênero *Polygala* é o mais rico da família *Polygalaceae* com um número superior a 100 espécies (Ludtke *et al.*, 2008). As plantas do gênero *Polygala* apresentam ampla distribuição geográfica (Marques e Peixoto, 2007). A literatura descreve a ocorrência de 19 espécies no Estado de Santa Catarina, dentre elas a *Polygala sabulosa* (Wurdack e Smith, 1971).

As espécies que constituem o gênero *Polygala* são em sua maioria ervas e subarbustos, e em número escasso árvores. Estas espécies possuem folhas alternas, opostas e verticiladas, com flores brancas, esverdeadas, roxas ou rosas apresentando apenas um plano de simetria (zigomorfas). Além disso, estas espécies são hermafroditas e seus frutos capsulares, drupáceos ou samaróides e sementes com corpo glabro, pubérulo e globoso (Mendes, 2008; Wurdack e Smith, 1971).

As plantas do gênero *Polygala* possuem um histórico de uso etnofarmacológico para o tratamento de diversas patologias, incluindo doenças do intestino e dos rins, como remédio tônico, como anestésico tópico e, como expectorante (Wasicky, 1945). Entretanto, poucas espécies do gênero *Polygala* foram pesquisadas quanto aos aspectos químicos e biológicos com destaque para os estudos de atividade antiinflamatória (Kou *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2008), antinociceptiva

(Meotti *et al.*, 2006; Ribas *et al.*, 2008), antioxidante (Cervellati *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2008), antiviral (Cyang *et al.*, 2000), tripanomicida (Pizzolatti *et al.*, 2003), inibidor tumoral (Mak *et al.*, 2001), neuritogênica (Ha *et al.*, 2006; Mak *et al.*, 2001), neuroprotetora (Yabe *et al.*, 2003; Farina *et al.*, 2005; Franco *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2008), antipsicótica (Chung *et al.*, 2002; Shin *et al.*, 2004) e anti-estresse (Kawashima *et al.*, 2004). Além disso, um estudo recente do nosso grupo com a escopoletina, uma cumarina isolada da *Polygala sabulosa*, mostrou que a mesma produz uma ação tipo antidepressiva, em ensaio pré-clínico, no teste da suspensão pela cauda (TSC) e no modelo de estresse agudo por contenção no teste do nado forçado (TNF) (Capra *et al.*, 2010).

A espécie Polygala sabulosa

Polygala sabulosa A. W. Bennett (Figura 1), conhecida vulgarmente como “timuto-pinheirinho”, é uma erva glabra, lenhosa na base, com ramos compridos, folhas alternas, numerosas e laminares. Esta espécie floresce de novembro a fevereiro apresentando flores brancas, rosas e roxas. Os frutos são capsulares e as sementes elipsóides (Figura 2). É uma espécie característica da “Zona dos campos” do planalto meridional catarinense onde apresenta uma vasta dispersão, principalmente, nos campos úmidos e nas beiras de riachos junto à vegetação graminácea alta ou arbustiva (Wurdack e Smith, 1971). Assim como muitas das espécies de seu gênero, a *P. sabulosa* também apresenta relatos de sua aplicação na medicina popular, sendo rotineiramente utilizada como anestésico local e expectorante.



Figura 1. *Polygala sabulosa* (Polygalaceae)
(Foto gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Moacir Pizzolatti).

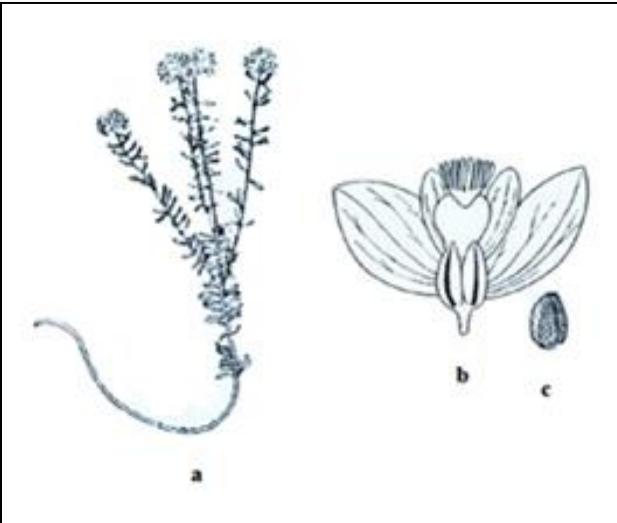


Figura 2. Ilustração da *Polygala sabulosa* A. W. Bennett
(a. ramo basal, b. flor, c. semente). Adaptado de Wurdack
e Smith (1971).

1.2.2 Escopoletina, um derivado de *Polygala sabulosa*

A escopoletina (7-hidroxi-6-metoxicumarina) é uma cumarina presente em muitas plantas, incluindo a *Polygala sabulosa* (Meotti *et al.*, 2006; Franco *et al.*, 2007; Siddiqui *et al.*, 2007; Ikeda *et al.*, 2009). Estudos indicam que esta cumarina possui diversas ações biológicas, tais como: anticolinesterásico (Orhan *et al.*, 2008), antinociceptivo (Ribas *et al.*, 2008), anti-inflamatório (Kim *et al.*, 2004), anti-hipertireoidiano, antioxidante, antihiperglicêmico, (Panda e Kar, 2006; Lin *et al.*, 2008), hipouricêmico (Ding *et al.*, 2005) e antitumoral (Liu *et al.*, 2001). Além disso, Sairam *et al.* (2007) demonstraram que alguns derivados de cumarinas podem possuir ação inibitória sobre a monoamina oxidase A, uma enzima alvo nos tratamentos convencionais para a depressão. Um estudo recente de nosso grupo mostrou que a escopoletina produz um efeito antidepressivo no TSC e é capaz de reverter o comportamento tipo depressivo induzido pelo estresse agudo por imobilidade (estresse de contenção). Além disso, esse trabalho forneceu evidências de que o efeito antidepressivo da escopoletina no TSC é dependente da interação com os sistemas serotoninérgicos (receptores 5-HT_{2A/2C}); noradrenérgicos (receptores α_1 e α_2 adrenérgicos) e dopaminérgicos (receptores D₁ e D₂). Os resultados sugerem que a escopoletina apresenta atividade farmacológica antidepressiva em nível pré-clínico similar aos antidepressivos clássicos, sugerindo que a escopoletina (Figura 3) poderá ser futuramente avaliada como um potencial agente terapêutico para o tratamento da depressão (Capra *et al.*, 2010).

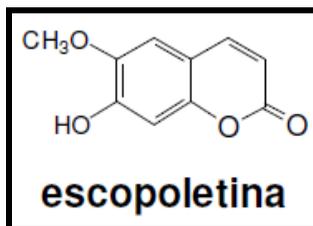


Figura 3. Fórmula estrutural da escopoletina.

1.2.3 Relação estrutura química e atividade biológica

Após a obtenção de um composto biologicamente ativo (Figura 4), é possível realizar estudos para sua modificação molecular (Korolkovas e Ferreira, 1988; Korolkovas, 1989; Yunes e Filho, 1998). Várias alterações podem ser introduzidas numa molécula dependendo dos seus grupos funcionais (Yunes e Filho, 1998). Primeiramente, realizam-se modificações procurando encontrar grupos que conferem ao composto em estudo uma maior ou menor hidrofobicidade ou grupos doadores e/ou aceptores de elétrons, a polarizabilidade necessária, bem como efeitos estéricos de orbitais moleculares gerados a partir da alteração desejada permitindo, posteriormente, a aplicação de algum método de correlação entre a estrutura química e a atividade biológica que pode ser qualitativa como quantitativa (Yunes e Filho, 1998).

Segundo Yunes e Filho (1998), diversos métodos de correlação estrutura-atividade foram desenvolvidos para o planejamento racional de novas moléculas ativas. Dentre eles, o mais usado foi descrito por Hansch e colaboradores (1971).

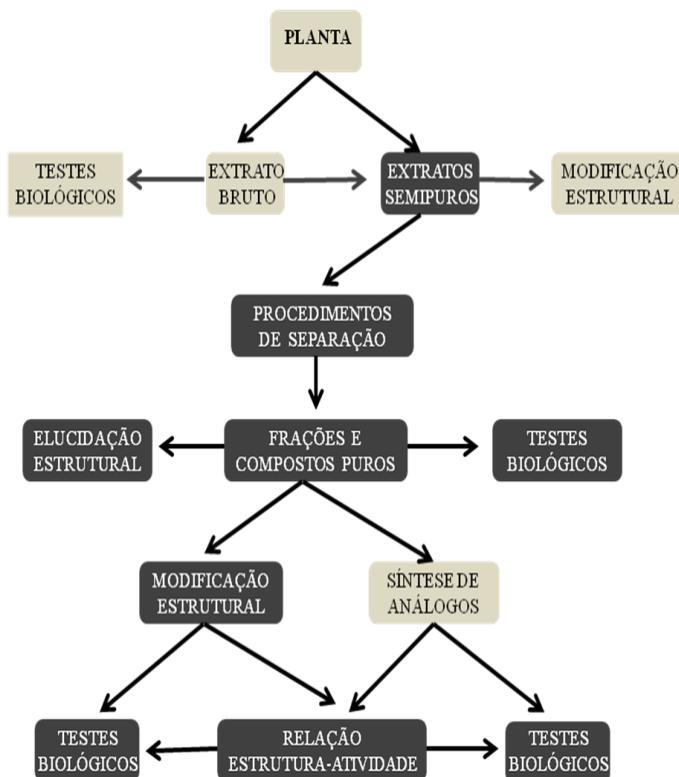


Figura 4. Esquema dos procedimentos gerais para obtenção de princípios ativos de plantas, frações e compostos puros, modificações estruturais e screenings biológicos. Os quadros em preto indicam, em linhas gerais, a rota de obtenção dos DSEs e os testes biológicos. Adaptado de Yunes e Filho (1998).

1.2.4 Derivados semissintéticos da escopoletina (DSEs) obtida da *Polygala sabulosa* e a relação estrutura atividade

A escopoletina pode ter sua estrutura química modificada, dando origem a derivados semissintéticos. Sugeriu-se que a escopoletina e seus derivados podem ser úteis no desenvolvimento de novas drogas analgésicas para controle da dor inflamatória e visceral (Meotti *et al.*, 2006). A escopoletina apresentou uma ID₅₀ (dose capaz de inibir em 50% as contorções em relação ao controle) no teste de contorção abdominal em ratos, aproximadamente, entre 313 a 400 vezes mais potente do que o paracetamol e a aspirina, enquanto que o benzoato de escopoletina, um DSE, apresentou uma ID₅₀ duas vezes mais potente do

que a escopoletina (Meotti *et al.*, 2006). Desta forma, hipotetizamos que alterações em grupos funcionais da molécula poderiam produzir melhor efeito antidepressivo em relação à molécula original. Desta forma, no presente estudo pretendemos avaliar a relação estrutura-atividade dos DSEs obtida da *Polygala sabulosa* (p-clorobenzoato de escopoletina, p-metilbenzoato de escopoletina, p-bromobenzoato de escopoletina e octanoato de escopoletina) e compará-la a seu composto de partida (Figura 5).

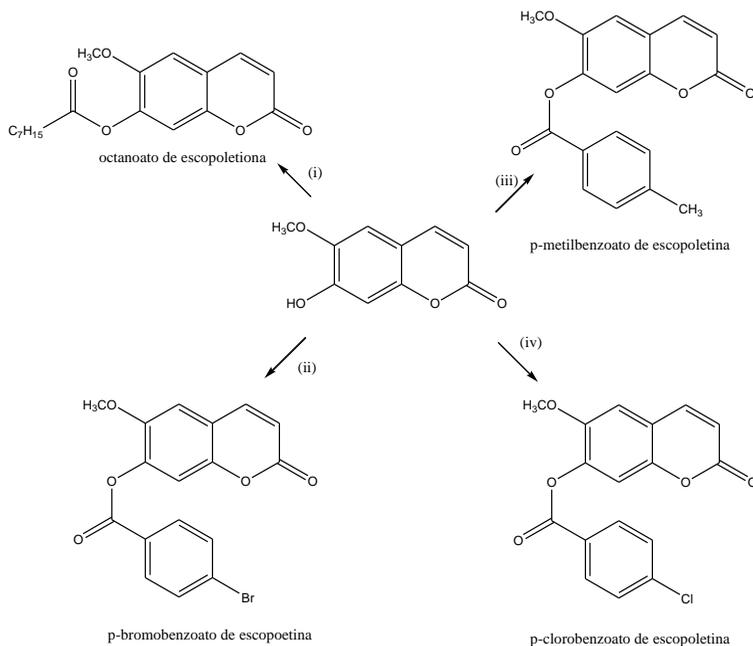


Figura 5. Estrutura química da escopoletina e dos DSEs octanoato de escopoletina, p-metilbenzoato de escopoletina, p-bromobenzoato de escopoletina e p-clorobenzoato de escopoletina. Reagentes: (i) cloreto de octanoíla; (ii) cloreto de p-bromobenzoíla; (iii) cloreto de p-metilbenzoíla; (iv) cloreto de p-clorobenzoíla.

1.3 MODELOS ANIMAIS

Modelos animais são ferramentas indispensáveis na pesquisa que visa identificar novos compostos com possível ação antidepressiva e para fornecer novos conhecimentos sobre as bases neurobiológicas da

depressão (Cryan *et al.*, 2002). No entanto, muitos dos sintomas característicos da depressão como humor deprimido e sentimentos de culpa não podem ser avaliados em laboratório. Além disso, a falta de conhecimento de genes envolvidos na patofisiologia da doença torna difícil a reprodutibilidade das causas genéticas na pesquisa pré-clínica (Nestler *et al.*, 2002). Dessa forma, os modelos animais de depressão disponíveis baseiam-se em dois princípios: resposta a antidepressivos conhecidos e resposta ao estresse (Nestler *et al.*, 2002).

Modelos com validade preditiva, como o TNF e o TSC são amplamente utilizados para o estudo da depressão (Nestler *et al.*, 2002; McArthur e Borsini, 2006). O TNF foi descrito primeiramente por Porsolt *et al.* (1977), sendo utilizado em ratos e posteriormente em camundongos, enquanto o TSC foi descrito por Steru *et al.* (1985) para ser utilizado em camundongos. Estes dois modelos são amplamente utilizados na busca por compostos com possível ação antidepressiva (Bourin *et al.*, 2005); são de fácil uso e de boa reprodutibilidade (Cryan *et al.*, 2002).

2. JUSTIFICATIVA

A depressão é uma das doenças neuropsiquiátricas mais prevalentes, que causa uma considerável morbidade psiquiátrica e perda de produtividade (Ebmeier *et al.*, 2006), além de ser o principal fator de risco independente para o desenvolvimento de doenças arteriais coronarianas e isquemia cerebral, além de estar associada com risco de suicídio (Nemeroff e Owens, 2002). Adicionalmente, os fármacos utilizados para o tratamento da depressão apresentam baixa eficácia clínica (Nestler *et al.*, 2002) e causam diversos efeitos colaterais, o que muitas vezes contribui para o abandono do tratamento pelo paciente (Brunello *et al.*, 2002). Considerando o exposto, existe uma grande necessidade de desenvolvimento de terapias antidepressivas alternativas ou de substâncias que possam otimizar a eficácia clínica para o tratamento da depressão.

Segundo a Organização Mundial da Saúde, devido a dificuldades econômicas e falta de acesso a medicamentos, aproximadamente 65-80% da população mundial que vive em países em desenvolvimento depende essencialmente das plantas para seus cuidados primários de saúde (Calixto, 2005).

A importância deste estudo se justifica tendo em vista a elevada incidência de depressão e pela observação de que a descoberta de novas drogas para tratar a depressão tem sido dificultada pela falta de compreensão dos mecanismos moleculares e da patofisiologia da doença. Além disto, não existem relatos na literatura referentes a estudos sobre a ação antidepressiva de DSEs. Portanto, este estudo poderá auxiliar no futuro desenvolvimento de novas drogas com ação antidepressiva e/ou da sua eventual utilização na terapêutica da depressão.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar o possível efeito tipo-antidepressivo de DSEs (octanoato de escopoletina, p-metilbenzoato de escopoletina, p-clorobenzoato de escopoletina e p-bromobenzoato de escopoletina) no TSC em camundongos e estudar o mecanismo de ação do DSE de maior potência.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar o efeito de diferentes doses de DSEs, administrados pela via oral (p.o.), no TSC em camundongos.
- Verificar o efeito de DSEs na atividade locomotora de camundongos no teste do campo aberto (TCA).
- Investigar o efeito do DSE de maior potência administrado pela via p.o., em curva tempo-resposta no TSC.
- Verificar a participação do sistema serotoninérgico no efeito antidepressivo do DSE de maior atividade biológica no TSC.
- Investigar o efeito da interação entre o DSE de maior potência e antidepressivos clássicos inibidores da recaptação de serotonina (ISRS) (fluoxetina, paroxetina e sertralina), administrados p.o., em doses sub-efetivas, no TSC.
- Verificar a interação do DSE de maior potência e antidepressivos clássicos ISRS (fluoxetina, paroxetina e sertralina) na atividade locomotora no teste do campo aberto.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS

Camundongos Swiss fêmeas adultos (35-45 g) mantidos a temperatura de 20-22°C com livre acesso à água e comida, em ciclo claro/escuro 12:12 h (ciclo claro iniciando às 7:00 h) foram utilizados. Todos os experimentos foram realizados entre 11:00 e 17:00 h, com cada animal usado somente uma vez (N=8 animais por grupo). Os animais foram ambientados no local da experimentação 24 horas antes da observação comportamental. Os camundongos foram distribuídos de forma aleatória nos grupos experimentais. Os animais foram fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina e mantidos no Biotério Setorial do Departamento de Bioquímica. Os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Catarina (CEUA; PP00449).

4.2 DROGAS E TRATAMENTOS

As seguintes drogas foram utilizadas: DSEs (octanoato de escopoletina, p-metilbenzoato de escopoletina, p-clorobenzoato de escopoletina e p-bromobenzoato de escopoletina), p-clorofenilalanina metil éster (PCPA) (Sigma Chemical Co, USA), fluoxetina (Libbs Farmacêutica Ltda.), paroxetina (Eurofarma Laboratórios Ltda.), sertralina (Medley). Os DSEs foram diluídos em água destilada com 5% de Tween 80. O PCPA foi dissolvido em salina e os antidepressivos ISRS foram diluídos em água destilada. Todas as drogas foram administradas por via oral (p.o.) por gavagem em um volume constante de 10 ml/kg de peso corporal, exceto o PCPA que foi administrado por via intraperitoneal (i.p.) Animais controles receberam os veículos apropriados. Comida e água foram retiradas uma hora antes do início das administrações das drogas. As drogas ou veículo foram administrados 1 hora antes dos testes comportamentais (TSC ou TCA).

Com o objetivo de investigar a possível ação antidepressiva de DSEs no TSC, os animais foram tratados (p.o.), com água destilada contendo 5% de Tween 80 (grupo controle) ou diferentes doses de DSE 60 minutos antes do TSC. Os animais também foram submetidos ao TCA (seguindo-se o mesmo protocolo) a fim de excluir a possibilidade de que a diminuição do tempo de imobilidade no TSC seja devido a uma estimulação motora.

A fim de se investigar a resposta do DSE de maior potência a diferentes tempos de administração (elaboração da curva tempo-resposta), os animais foram tratados com veículo ou com dose ativa de DSE (10^{-2} mg/kg, p.o.) 30, 60 e 120 minutos antes de submetê-los ao TSC (Posser *et al.*, 2009).

Com o intuito de investigar o envolvimento do sistema serotoninérgico na ação antidepressiva do DSE de maior potência, os camundongos foram tratados com o inibidor da síntese de serotonina, PCPA conforme descrito previamente (Rodrigues *et al.*, 2002; Kaster *et al.*, 2005). O tratamento com PCPA (100 mg/kg, i.p.) foi feito uma vez ao dia, durante quatro dias consecutivos. Vinte e quatro horas após a última injeção de PCPA, o DSE foi administrado e os animais foram submetidos ao TSC após 60 minutos.

Além disso, nos estudos que visam analisar o efeito sinérgico de doses sub-efetivas do DSE de maior potência com doses sub-efetivas de antidepressivos ISRS no TSC, a administração de DSE de maior potência ou veículo foi seguida imediatamente pela administração de drogas antidepressivas ISRS ou veículo, uma hora antes dos testes comportamentais (Cunha *et al.*, 2008; Binfaré *et al.*, 2009).

4.3 PREPARAÇÃO DOS DSEs

A preparação dos DSEs bem como as análises químicas foram realizadas no Departamento de Química-UFSC sob a orientação do professor Moacir G. Pizzolatti, através de um estudo de ensaio biomonitorado.

4.3.1 Obtenção da escopoletina a partir da preniloxicumarina

A escopoletina [2] utilizada neste trabalho é isolada em pequena quantidade na *P. sabulosa*, fato que inviabilizaria um trabalho deste tipo. Como a preniloxicumarina [1] é um dos metabólitos secundários majoritário nesta espécie e possui sua cadeia lateral oxiprenilada, tomou-se como alternativa obter a escopoletina [2] a partir desta cumarina. Para isso, é feita a reação mostrada na Figura 6.

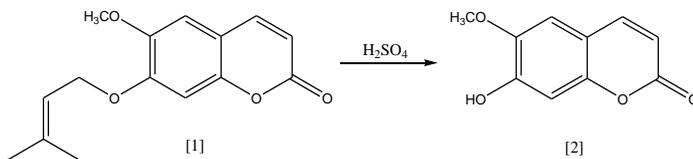


Figura 6. Reação de hidrólise ácida da preniloxicumarina

A 1,0 g (3,84 mmol) de preniloxicumarina em etanol adicionou-se 3 mL de água e sob vigorosa agitação 2 mL de H_2SO_4 (0,037 mmol) concentrado. O sistema foi mantido em agitação até que todo substrato fosse consumido. O precipitado formado na reação foi purificado através de filtração a vácuo, obtendo-se o composto de interesse no resíduo sólido. Para otimizar o rendimento, o filtrado foi ainda extraído 3 vezes com clorofórmio. A fase orgânica foi seca sob sulfato de sódio anidro, evaporada, e então reunida ao resíduo sólido, sendo o produto recristalizado em acetona (77 % rendimento). pf: 203 – 204°C; RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) (ppm): 7,60 (d, 1H, $J=9,6$ Hz, H-3), 6,91 (s, 1H, H-8), 6,85 (s, 1H, H-5), 6,27 (d, 1H, $J=9,6$ Hz, H-4), 6,22 (s, 1H, OH), 3,95 (s, 3H, 6-OCH₃).

4.3.2 Metodologia geral para benzoilação/acilação da escopoletina

A escopoletina (1 mmol) foi dissolvida em piridina e tratada com excesso do respectivo cloreto de acila/benzoíla (1,2 mmol), a mistura reacional foi mantida sob refluxo até que todo substrato fosse consumido. A formação do produto foi monitorada através de CCD (cromatografia em camada delgada) utilizando como eluente a mistura hexano: acetato de etila (7:3 v:v). Ao final, adicionou-se 30 mL de CHCl_3 ao sistema, e em funil de separação, extraiu-se o excesso de piridina com uma solução aquosa $\text{pH} \pm 2$ com HCl (4 X 25 mL). A fase orgânica foi lavada com uma solução de NaHCO_3 a 10% (4 X 25 mL), seca sob Na_2SO_4 anidro, evaporada e então purificada usando coluna flash de sílica gel eluída com hexano:AcOEt (6:4 v:v)

4.3.3 Síntese do octanoato de escopoletina

O composto octanoato de escopoletina [4] foi preparado de acordo com o procedimento geral descrito no item 4.3.2, usando uma solução de escopoletina [1] (1 mmol) e cloreto de octanoíla [3] (1,2

mmol) (Figura 7). O produto purificado foi obtido como um sólido marrom claro (43,2 % rendimento). Pf: 97-98; RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 7,59(d, 1H, $J=9,57$ Hz, H-4), 6,90 (s, 1H, H-8), 6,84 (s, 1H, H-5), 6,25 (d, 1H, $J=9,57$ Hz, H-3), 4,01 (s, 3H, OCH_3), 2,04 (t, 2H, H-2'), 1,80(m, 2H, H-3'), 1,45 (m, 2H, H-7'), 1,24 (m, 4H, H-4'5'), 0,88(s, 3H, H-8').

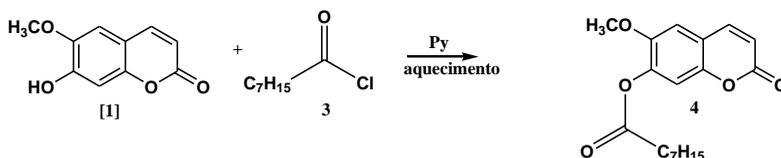


Figura 7. Síntese do octanoato de escopoletina

4.3.4 Síntese do p-clorobenzoato de escopoletina

O composto p-clorobenzoato de escopoletina [6] foi preparado de acordo com o procedimento geral descrito no item 4.3.2., usando uma solução de escopoletina [1] (1 mmol) e cloreto de p-clorobenzoíla [5] (1,2 mmol). O produto purificado foi obtido como um sólido de cor branca (85,4% rendimento). Pf: 149 - 153,4°C, RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 8,14(d, 2H, $J=8,4$ Hz, H-2',6'), 7,66 (d, 1H, $J=9,6$ Hz, H-4), 7,52 (d, 2H, $J=8,4$ Hz, H-3',5'), 7,20 (s, 1H, H-8), 7,01 (s, 1H, H-5), 6,45 (d, 1H, $J=9,6$ Hz, H-3), 3,63 (s, 3H, 6- OCH_3).

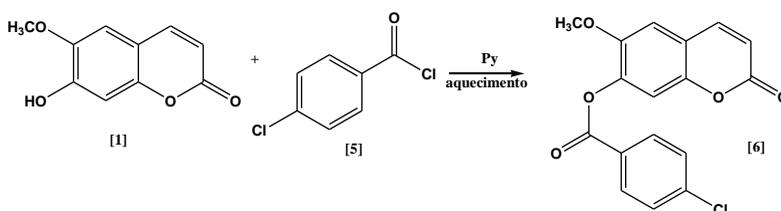


Figura 8. Síntese do p-clorobenzoato de escopoletina

4.3.5 Síntese do p-bromobenzoato de escopoletina

O composto p-bromobenzoato de escopoletina [8] foi preparado de acordo com o procedimento geral descrito no item 4.3.2., usando uma solução de escopoletina [1] (1 mmol) e cloreto de p-bromobenzoíla [7] (1,2 mmol) (Figura 9). O produto purificado foi obtido como um sólido

de cor branca (19,6% rendimento). Pf: 217 - 219°C; RMN 1H (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 8,07 (d, 2H, J=8,4 Hz, H-2',6'), 7,69 (d, 1H, J=9,2 Hz, H-4), 7,67 (d, 2H, J=8,4 Hz, H-3',5'), 7,21 (s, 1H, H-8), 7,02 (s, 1H, H-5), 6,45 (d, 1H, J=9,2 Hz, H-3), 3,86 (s, 3H, 6-OCH₃).

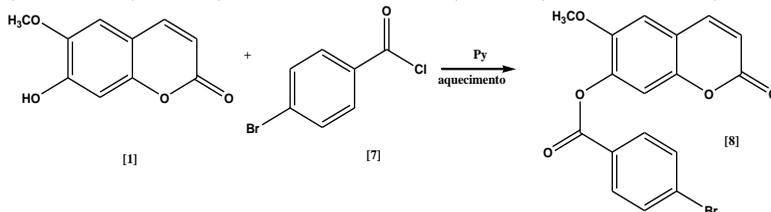


Figura 9. Síntese do p-bromobenzoato de escopoletina

4.3.6 Síntese do p-metilbenzoato de escopoletina

O composto p-metilbenzoato de escopoletina [10] foi preparado de acordo com o procedimento geral descrito no item 4.3.2, usando uma solução de escopoletina [1] (1 mmol) e cloreto de p-metilbenzoíla [9] (1,2 mmol) (Figura 10). O produto purificado foi obtido como um sólido de cor branca (94% rendimento). Pf: 127 - 131°C; RMN 1H (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 8,10 (d, 2H, J=8,4 Hz, H-2',6'), 7,69 (d, 1H, J=9,2 Hz, H-4), 7,33 (d, 2H, J=8,4 Hz, H-3',5'), 7,22 (s, 1H, H-8), 7,01 (s, 1H, H-5), 6,45 (d, 1H, J=9,2 Hz, H-3), 3,86 (s, 3H, 6-OCH₃), 2,47 (s, 3H, CH₃).

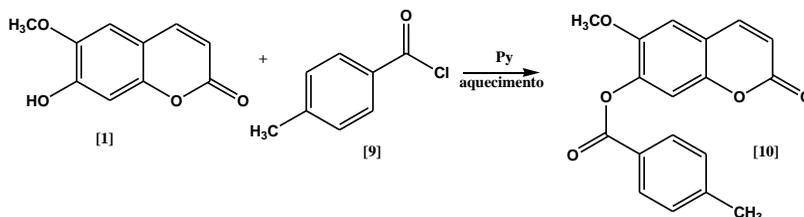


Figura 10. Síntese do p-metilbenzoato de escopoletina

4.4 TESTES COMPORTAMENTAIS

4.4.1 Teste da suspensão pela cauda

Este modelo foi proposto por Steru *et al.* (1985) como alternativa ao TNF para o estudo de compostos com possível atividade antidepressiva, uma vez que parece ser menos estressante que o TNF (Thierry *et al.*, 1986). O tempo de imobilidade foi avaliado durante um

período de 6 minutos em camundongos acústica e visualmente isolados, suspensos pelo menos 50 cm acima do chão e presos pela extremidade da cauda com fita adesiva (Mantovani *et al.*, 2003; Binfaré *et al.*, 2009).

No presente estudo, foi investigado o potencial antidepressivo dos DSEs no teste preditivo de atividade antidepressiva TSC e não TNF, visto que dados prévios de nosso grupo demonstraram que a escopoletina apresentou potencial antidepressivo apenas no TSC (Capra *et al.*, 2010). Por este motivo, escolhemos este teste, demonstrado na Figura 11.



Figura 11. Teste da suspensão pela cauda (TSC)

4.4.2 Teste do campo aberto

A fim de excluir a possibilidade de que a diminuição do tempo de imobilidade no TSC seja devido a uma estimulação motora, os animais foram submetidos ao teste do campo aberto, durante 6 minutos (Rodrigues *et al.*, 1996). Este teste é realizado em uma caixa de madeira medindo 40x60x50 cm, com o chão dividido em 12 quadrados iguais. O número de quadrados cruzados com todas as patas corresponde ao cruzamento e foi o parâmetro utilizado para avaliar a atividade locomotora, demonstrado na Figura 12.



Figura 12. Teste do campo aberto (TCA), A (visão frontal) e B (visão superior).

4.5 ANÁLISE DO MECANISMO DE AÇÃO ANTIDEPRESSIVA DO p-BROMO BENZOATO DE ESCOPOLETINA (DSE DE MAIOR POTÊNCIA NO TSC) ATRAVÉS DE ESTUDOS FARMACOLÓGICOS IN VIVO

4.5.1 Protocolo Experimental

Curva de doses crescentes de Derivados Semissintéticos da Escopoletina (DSEs) e curva tempo respondada do DSE de maior potência

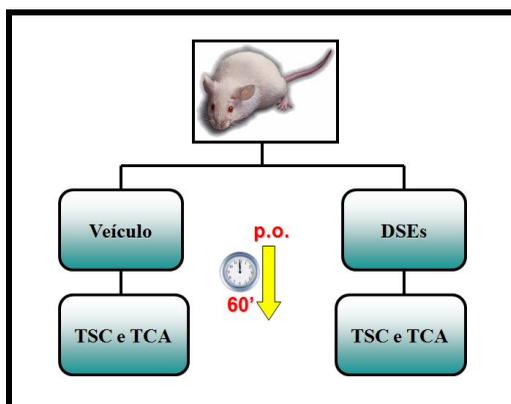


Figura 13. Esquema da curva de doses crescentes de DSEs no TSC e TCA. Os DSEs foram administrados p.o. 60 minutos antes do TSC e/ou TCA. O grupo controle recebeu o tratamento com água destilada + 5% de Tween 80, por via oral.

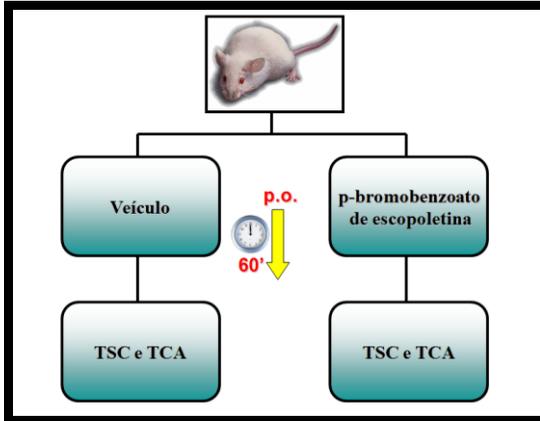


Figura 14. Esquema da curva de doses crescentes do DSE de maior potência (p-bromobenzoato de escopoletina) no TSC e TCA. O p-bromobenzoato de escopoletina foi administrado p.o., sessenta minutos antes do TSC e TCA. O grupo controle recebeu o tratamento com água destilada + 5% de Tween 80, por via oral.

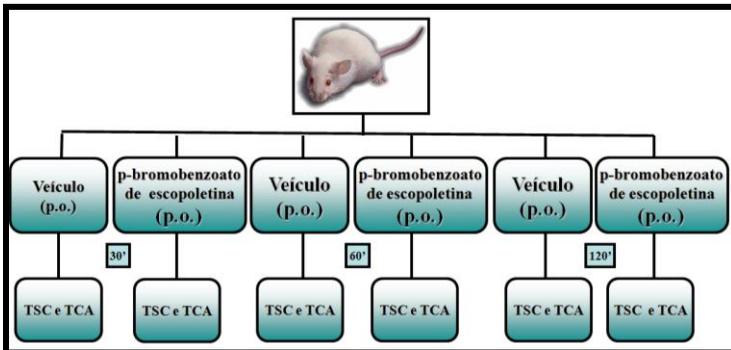


Figura 15. Esquema utilizado para elaboração da curva tempo-resposta do p-bromobenzoato de escopoletina quando administrado por via p.o no TSC. A dose de p-bromobenzoato de escopoletina utilizada foi 10^{-2} mg/kg. Todos os grupos utilizados para controle receberam veículo apropriado.

Investigação do mecanismo de ação serotoninérgico do p-bromobenzoato de escopoletina e efeito sinérgico com antidepressivos clássicos no TSC

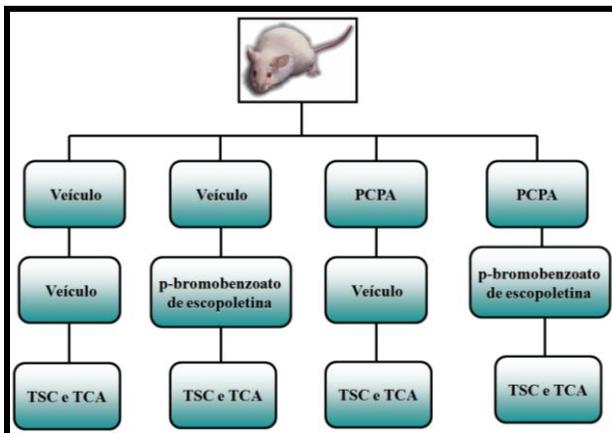


Figura 16. Esquema representativo da investigação do mecanismo de ação serotoninérgico do DSE de maior potência (p-bromobenzoato de escopoletina). Os camundongos foram tratados com o inibidor da síntese de serotonina, PCPA (100 mg/kg, i.p.), uma vez ao dia, durante quatro dias consecutivos. Vinte e quatro horas após a última injeção de PCPA, 4-bromobenzoato de escopoletina foi administrado e os animais foram submetidos ao TSC após 60 minutos.

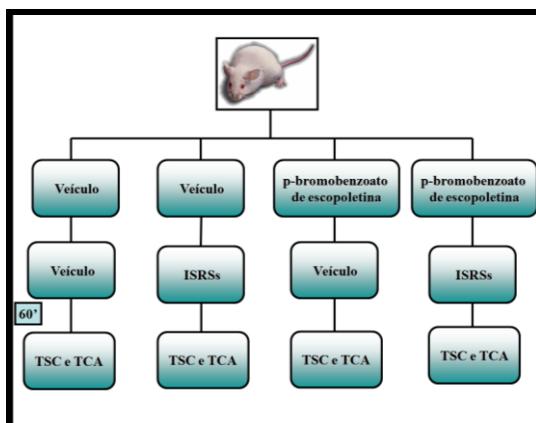


Figura 17. Esquema da interação do DSE de maior potência (p-bromobenzoato de escopoletina) e antidepressivos convencionais ISRS no TSC e no TCA. Doses sub-efetivas de p-bromobenzoato de escopoletina (10^{-6} mg/kg), fluoxetina (5 mg/kg), paroxetina (0,1 mg/kg) e sertralina (3 mg/kg) no TSC foram utilizadas. Os animais receberam o pré-tratamento com p-bromobenzoato de escopoletina ou veículo e imediatamente após esta administração receberam o tratamento com antidepressivo ISRS (fluoxetina, paroxetina e sertralina) ou veículo. As co-administrações aconteceram 60 minutos antes do TSC.

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos foram avaliados através da análise de variância (ANOVA) de uma via (curvas dose-resposta) e de duas vias (curva tempo-resposta, experimento com PCPA e experimentos de sinergismo com antidepressivos), seguindo o teste de Newman-Keuls quando apropriado. Os resultados foram considerados significativos para $P < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 A AVALIAÇÃO DO EFEITO DE DSEs NA AÇÃO TIPO-ANTIDEPRESSIVO NO TSC E NA ATIVIDADE LOCOMOTORA NO TESTE DO CAMPO ABERTO EM CAMUNDONGOS

Os resultados da Figura 18 mostram que os DSEs (octanoato de escopoletina (10^{-2} -10 mg/kg); p-metilbenzoato de escopoletina (10^{-2} -10 mg/kg); p-clorobenzoato de escopoletina (10^{-2} - 10^2 mg/kg); p-bromobenzoato de escopoletina (10^{-6} -10 mg/kg), administrados por via oral, reduzem o tempo de imobilidade dos animais no TSC. A ANOVA de uma via revelou um efeito tipo-antidepressivo significativo para tratamento por via oral da octanoato de escopoletina (10^{-1} -1 mg/kg, p.o) [F(4,27) = 3.74; P < 0.05] (Fig. 18A), p-metilbenzoato de escopoletina (1 – 10 mg/kg, p.o) [F (4,38) = 21.74; P < 0.01] (Fig. 18B), p-clorobenzoato de escopoletina (10^{-1} – 10 mg/kg, p.o) [F (5,35) = 7.23; P < 0.01] (Fig. 18C) e p-bromobenzoato de escopoletina (10^{-5} -10 mg/kg) [F(8,58) = 5,34, P < 0,01 (Fig. 18D).

A Figura 18A ilustra que a octanoato de escopoletina reduziu significativamente o tempo de imobilidade dos animais nas doses de 10^{-1} - 1 mg/kg, mas não nas doses de 10^{-2} e 10 mg/kg no TSC quando comparado ao grupo de animais tratados com veículo (V). A Figura 18B mostra que a p-metilbenzoato de escopoletina diminuiu significativamente o tempo de imobilidade somente nas doses de 1 e 10 mg/kg, mas não nas doses de 10^{-2} e 10^{-1} mg/kg. Como ilustrado na Figura 18C, a p-clorobenzoato de escopoletina reduziu o tempo de imobilidade nas doses de 10^{-1} – 10 mg/kg, mas não nas doses de 10^{-2} e 10^2 mg/kg. Adicionalmente, a Figura 18D ilustra que a p-bromobenzoato de escopoletina apresentou efeito tipo-antidepressivo nas doses de 10^{-5} -10 mg/kg, mas não apresentou efeito significativo na redução do tempo de imobilidade na dose de 10^{-6} mg/kg.

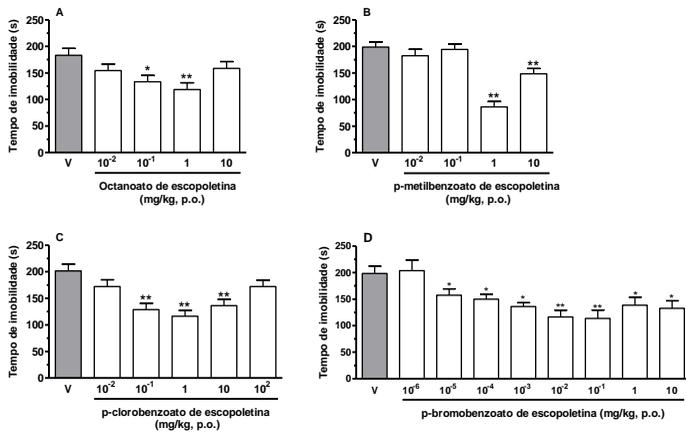


Figura 18. Efeito do tratamento com octanoato de escopoletina (10^{-2} -10 mg/kg, p.o., painel A), p-metilbenzoato de escopoletina (10^{-2} -10 mg/kg, p.o., painel B), p-clorobenzoato de escopoletina (10^{-2} -10² mg/kg, p.o., painel C), p-bromobenzoato de escopoletina (10^{-6} -10 mg/kg, p.o., painel D) ou veículo no TSC em camundongos. Os valores estão expressos como média + E.P.M. *P<0,05 e **P<0,01 quando comparado aos animais tratados com veículo (V).

A Figura 19 mostra que a administração dos DSEs (octanoato de escopoletina, p-metilbenzoato de escopoletina, p-clorobenzoato de escopoletina ou p-bromobenzoato de escopoletina) não alterou a atividade locomotora dos animais no teste do campo aberto ([F(8,44) = 1,16, $P=0,34$]; F (5,32)=0,55, $P=0,73$; F (4,24)=2,38, $P=0,08$ e F (4,30)=0,65, $P=0,63$, respectivamente), indicando que um possível efeito psicoestimulante deve ser descartado no efeito tipo-antidepressivo destes derivados no TSC.

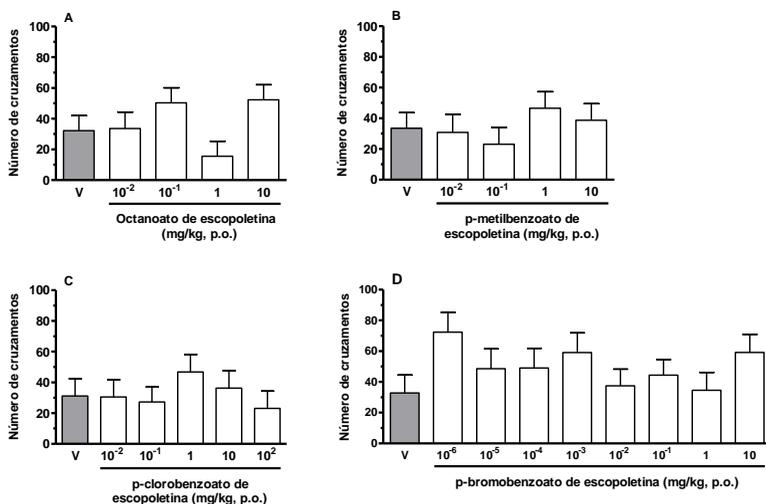


Figura 19. Efeito do tratamento com octanoato de escopoletina (10^{-2} -10 mg/kg, p.o., painel A), p-metilbenzoato de escopoletina (10^{-2} -10 mg/kg, p.o., painel B), p-clorobenzoato de escopoletina (10^{-2} - 10^2 mg/kg, p.o., painel C), p-bromobenzoato de escopoletina (10^{-6} -10 mg/kg, p.o., painel D) ou veículo no TCA em camundongos. Os valores estão expressos como média + E.P.M. ** $P < 0,01$ e * $P < 0,05$ quando comparado aos animais tratados com veículo (V).

Como mostra a Figura 18, entre os DSEs da *Polygala sabulosa*, a p-bromobenzoato de escopoletina exibiu a melhor performance no TSC. Portanto, este derivado foi escolhido, por nosso grupo, para investigar o possível mecanismo de ação deste composto no TSC. Posteriormente, foi investigado, através de uma curva tempo-resposta, o tempo em que a p-bromobenzoato de escopoletina apresentou melhor performance no TSC. A Figura 20A ilustra que 60 e 120 minutos após a administração da p-bromobenzoato de escopoletina (10^{-2} mg/kg, p.o.) produziu efeito tipo-antidepressivo no TSC. A ANOVA de duas vias revelou uma diferença significativa do tratamento com a p-bromobenzoato de escopoletina [$F(2,40)=4,07$ $P < 0,05$], tempo [$F(1,40)=23,53$, $P < 0,01$] e interação tratamento \times tempo [$F(2,40)=7,30$, $P < 0,01$]. O teste *post hoc* de Newman Keuls indicou que a p-bromobenzoato de escopoletina exibiu o melhor efeito tipo-antidepressivo no intervalo de 60 minutos. O intervalo de 30 minutos não apresentou efeito tipo-antidepressivo no TSC. A Figura 20B mostra que a administração de p-bromobenzoato de

escopoletina (10^{-2} mg/kg, p.o.) nos três tempos não apresentou nenhum efeito no teste do campo aberto. A ANOVA de duas vias não revelou nenhuma diferença para o tratamento [$F(2,40) = 0,79, P=0,46$], tempo [$F(1,40) = 3,09, P=0,09$] e interação tratamento \times tempo [$F(2,40) = 0,25, P = 0,78$]. Considerando estes resultados, todos os experimentos foram realizados utilizando o intervalo de tempo de 60 minutos após a administração da p-bromobenzoato de escopoletina.

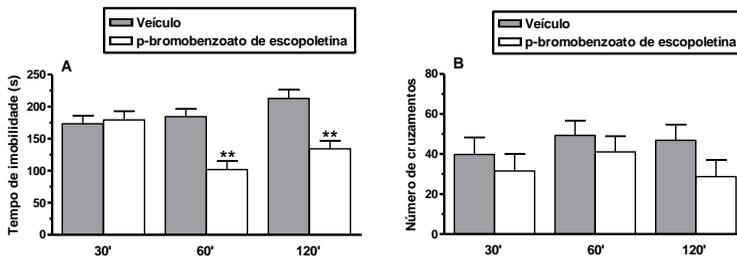


Figura 20. Efeito do tratamento agudo por via p.o. com p-bromobenzoato de escopoletina (10^{-2} mg/kg) 30, 60 ou 120 minutos antes do TSC (painel A) ou TCA (painel B). Os valores estão expressos como média + E.P.M. ($n = 6-7$), ** $P < 0,01$ quando comparado com o grupo controle tratado com veículo.

5.2 INVESTIGAÇÃO DO MECANISMO TIPO ANTIDEPRESSIVO DO p-BROMOBENZOATO DE ESCOPOLETINA NO TSC

5.2.1 Envolvimento do sistema serotoninérgico

Os resultados ilustrados na Figura 21A mostram que o pré-tratamento dos camundongos com o inibidor da síntese de serotonina PCPA (100 mg/kg, i.p., uma vez ao dia por 4 dias consecutivos) reverteu significativamente a redução do tempo de imobilidade induzido por p-bromobenzoato de escopoletina (10^{-2} mg/kg, p.o.). A ANOVA de duas vias revelou diferenças significativas do tratamento [$F(1,22) = 4,58, P < 0,05$] e interação pré-tratamento \times tratamento [$F(1,22) = 4,90, P < 0,05$], mas não do pré-tratamento com PCPA [$F(1,22) = 2,88, P = 0,10$]. A Figura 21B mostra que o pré-tratamento dos animais com PCPA sozinho ou em combinação com o DSE não produziu nenhum efeito no campo aberto. A ANOVA de duas vias não revelou nenhuma diferença significativa do pré-tratamento com PCPA [$F(1,22) = 2,43, P = 0,24$], tratamento [$F(1,22) = 0,12, P = 0,73$] e interação pré-tratamento \times tratamento [$F(1,22) = 1,54, P = 0,23$].

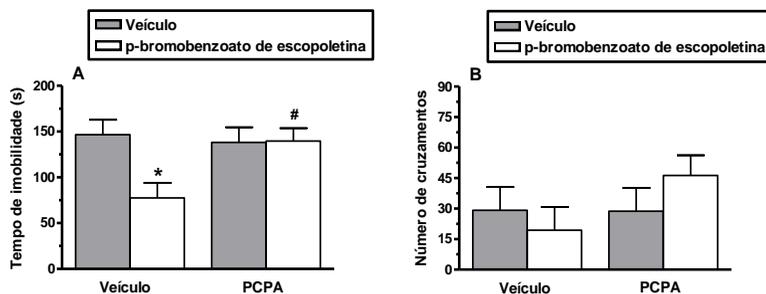


Figura 21. Efeito do pré-tratamento com um inibidor da síntese de serotonina, PCPA (100 mg/kg, durante 4 dias consecutivos) na redução do tempo de imobilidade do p-bromobenzoato de escopoletina (10^{-2} mg/kg, p.o.) no TSC (painel A) e no TCA (painel B) em camundongos. Os valores estão expressos como média + E.P.M. (n=8). * $p < 0,05$ quando comparado com o grupo controle tratado com veículo; # $P < 0,05$ quando comparado com o mesmo grupo pré-tratado com veículo.

5.2.2 Interação do p-bromobenzoato de escopoletina com antidepressivos convencionais no TSC

Neste trabalho também foi investigado o potencial efeito sinérgico da administração de doses sub-ativas de antidepressivos e dose sub-ativa da p-bromobenzoato de escopoletina. A Figura 22A mostra que a administração de uma dose sub-ativa de p-bromobenzoato de escopoletina (10^{-6} mg/kg, p.o.) potencializou uma dose sub-ativa da fluoxetina (5 mg/kg, p.o.) no TSC. A ANOVA de duas vias revelou diferenças significativas do pré-tratamento com fluoxetina [$F(1,29)=17,73$, $P < 0,01$], tratamento com p-bromobenzoato de escopoletina [$F(1,29)=16,26$, $P < 0,01$] e interação pré-tratamento \times tratamento [$F(1,29)=5,09$, $P < 0,05$]. Os resultados ilustrados na Figura 22B indicam que a administração de uma dose sub-ativa de p-bromobenzoato de escopoletina (10^{-6} mg/kg, p.o.) e uma dose sub-ativa de paroxetina (10^{-1} mg/kg, p.o.) reduziu o tempo de imobilidade dos animais no TSC. A ANOVA de duas vias indica diferenças significativas do pré-tratamento com paroxetina [$F(1,26) = 9,68$, $P < 0,01$], tratamento com p-bromobenzoato de escopoletina [$F(1,26) = 18,54$, $P < 0,01$] e interação pré-tratamento \times tratamento [$F(1,26) = 5,19$, $P < 0,05$]. A Figura 22C mostra que a administração combinada com doses sub-ativas de p-bromobenzoato de escopoletina (10^{-6} mg/kg, p.o.)

e sertralina (0,3 mg/kg, p.o.) reduziu o tempo de imobilidade dos camundongos submetidos ao TSC. A ANOVA de duas vias revelou diferenças significativas do pré-tratamento com sertralina [$F(1,26)=14,37$, $P<0,01$], tratamento com p-bromobenzoato de escopoletina [$F(1,26)=15,69$, $P<0,01$] e interação pré-tratamento \times tratamento $F(1,26)=4,41$, $P<0,05$].

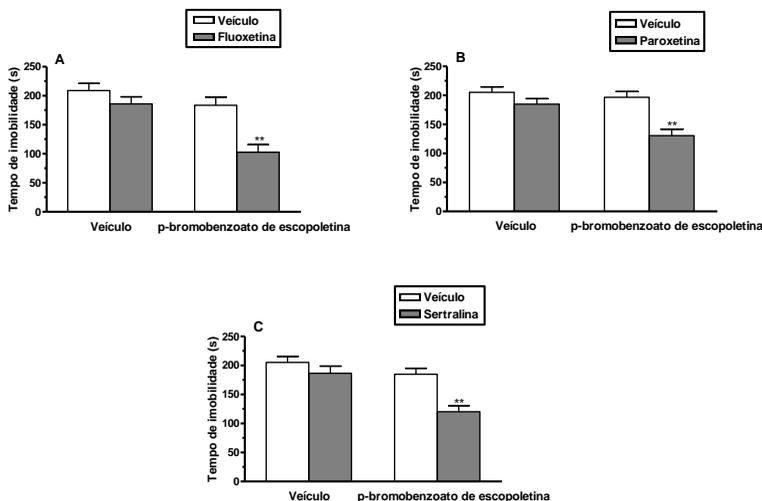


Figura 22. Efeito do tratamento dos animais com dose sub-ativa de p-bromobenzoato de escopoletina (10^{-6} mg/kg, p.o.) ou veículo (água + 5% Tween) em combinação com doses sub-ativas de antidepressivos: fluoxetina (painel A), paroxetina (painel B) e sertralina (painel C) administrados por via oral no tempo de imobilidade no TSC em camundongos. Os valores estão expressos como média + E.P.M. ** $P<0,01$ quando comparado aos animais tratados com veículo.

Finalmente, o efeito do tratamento combinado com doses sub-ativas de antidepressivos fluoxetina (5 mg/kg), paroxetina (10^{-1} mg/kg) ou sertralina (3 mg/kg) com uma dose sub-ativa de p-bromobenzoato de escopoletina foi verificado no teste do campo aberto. Os resultados apresentados na Figura 23A mostram que a administração da fluoxetina em combinação com p-bromobenzoato de escopoletina não afetou a ambulação dos animais. A ANOVA de duas vias não revelou diferenças para o pré-tratamento com fluoxetina [$F(1,27) = 3,18$, $P=0,08$], tratamento com p-bromobenzoato de escopoletina [$F(1,27) = 0,11$, $P=0,74$] e interação pré-tratamento \times tratamento [$F(1,27) = 0,36$, $P=0,55$]. A Figura 23B mostra que a administração de uma dose sub-

ativa de paroxetina combinada com uma dose sub-ativa de p-bromobenzoato de escopoletina não influencia a atividade locomotora dos camundongos. A ANOVA de duas vias não revelou diferenças significativas do pré-tratamento com paroxetina [$F(1,27) = 2,76, P=0,11$], tratamento com p-bromobenzoato de escopoletina [$F(1,27) = 1,00, P=0,33$] e interação pré-tratamento \times tratamento [$F(1,27) = 0,00, P=0,97$]. A Figura 23C mostra que a co-administração de doses sub-ativas de sertralina e p-bromobenzoato de escopoletina não afetou significativamente a atividade locomotora dos animais no campo aberto. A ANOVA de duas vias não revelou diferenças significativas do pré-tratamento com sertralina [$F(1,29) = 1,96, P=0,17$], tratamento com p-bromobenzoato de escopoletina [$F(1,29) = 2,44, P=0,13$] e interação pré-tratamento \times tratamento [$F(1,29) = 1,22, P=0,28$].

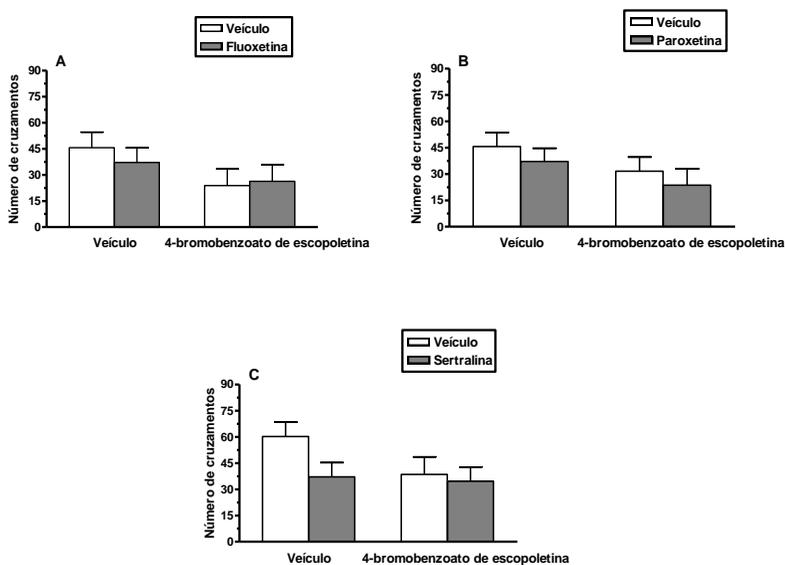


Figura 23. Efeito do tratamento dos animais com doses sub-ativas de p-bromobenzoato de escopoletina (10^{-6} mg/kg, p.o.) ou veículo (água + 5% Tween) em combinação com doses sub-ativas de antidepressivos: fluoxetina (painel A), paroxetina (painel B) e sertralina (painel C) administrados por via oral na atividade locomotora dos camundongos no TCA. Os valores estão expressos como média + E.P.M.

6 DISCUSSÃO

Os objetivos deste estudo foram: primeiramente, investigar a ação tipo-antidepressiva de DSEs octanoato de escopoletina, p-metilbenzoato de escopoletina, p-clorobenzoato de escopoletina e p-bromobenzoato de escopoletina; secundariamente, investigar o mecanismo de ação responsável por seu efeito tipo-antidepressivo no TSC. Para alcançar estes objetivos, inicialmente foi realizado um “screening” dos DSEs no qual foi selecionado o derivado de maior atividade biológica e em seguida, investigou-se o seu mecanismo de ação. Tendo em vista que um trabalho do nosso grupo com a cumarina escopoletina, composto de partida, apresentou atividade antidepressiva no TSC e não no TNF (Capra *et al.*, 2010) adotamos aquele teste.

O TSC é um modelo experimental amplamente utilizado na pesquisa de drogas com possível potencial antidepressivo, sendo que a maioria dos antidepressivos incluindo os tricíclicos, os inibidores da monoamina oxidase (MAO) e os atípicos reduzem o tempo de imobilidade neste teste (Steru *et al.*, 1985; Cryan *et al.*, 2005). O TSC tornou-se um dos modelos animais mais amplamente utilizados para o estudo de drogas com ação antidepressiva (Cryan *et al.*, 2005). Antidepressivos causam um aumento na tentativa de escape do animal quando suspenso pela cauda, a falta de mobilidade do animal submetido a este teste é considerado um estado de desespero comportamental (Steru *et al.*, 1985). No entanto, compostos que aumentam a atividade locomotora dos animais podem produzir um resultado falso positivo no TSC. Os efeitos de drogas psicoestimulantes podem ser diferenciados de antidepressivos por seu aumento na estimulação motora (Borsini and Meli, 1988). Dessa forma, o TCA é utilizado para excluir a possibilidade de que a redução no tempo de imobilidade produzida por uma droga, em estudo, seja devido a um aumento da atividade locomotora dos animais.

Compostos biologicamente ativos de plantas podem ser utilizados em estudos para sua modificação molecular (Korolkovas e Ferreira, 1988; Korolkovas, 1989; Yunes e Filho, 1998). Muitas mudanças podem ser introduzidas numa molécula, dependendo de seus grupos funcionais. Procura-se com estas mudanças introduzir grupos que conferem ao composto em estudo, o aumento ou diminuição de sua hidrofobicidade ou grupos doadores e/ou aceptores de elétrons possibilitando com isto, a aplicação de métodos de correlação entre a estrutura química e a atividade biológica que pode ser qualitativa como quantitativa (Yunes e Filho, 1998).

No presente estudo, todos os quatro DSEs foram efetivos em reduzir o tempo de imobilidade em camundongos no TSC. No entanto, a p-bromobenzoato de escopoletina, notavelmente, causou um efeito significativo numa ampla faixa de doses muito baixas no TSC. Este derivado possui uma potência antidepressiva no TSC 10.000 vezes maior do que o octanoato de escopoletina e da p-clorobenzoato de escopoletina e 100.000 vezes maior do que a p-metilbenzoato de escopoletina. Além disso, deve ser enfatizado que, quando comparado ao efeito da escopoletina no TSC (Capra *et al.*, 2010), a p-bromobenzoato de escopoletina foi, aproximadamente, 1.000.000 vezes mais potente. Embora, a eficácia da resposta em relação à redução do tempo de imobilidade no TSC seja similar entre os diferentes derivados (em torno de 40% de redução do tempo de imobilidade, exceto a p-metilbenzoato de escopoletina que apresentou 56,8% de redução na dose de 1 mg/kg), esta é um pouco mais alta do que a produzida pela escopoletina (máximo de 32,7% de redução no tempo de imobilidade) (Capra *et al.*, 2010). Surpreendentemente, quando comparado à fluoxetina, a potência da p-bromobenzoato de escopoletina foi, aproximadamente, 1.000.000 de vezes maior em relação à capacidade de provocar uma diminuição no tempo de imobilidade no TSC (em torno de 40% em comparação ao grupo controle). Portanto, nosso estudo indica que a adição do grupo p-bromobenzoato aumentou a propriedade antidepressiva da escopoletina. Uma possibilidade é que o grupo p-bromobenzoato aumentou a absorção do composto ou facilitou a sua interação com o alvo molecular responsável pelo efeito antidepressivo no TSC.

Embora haja semelhança entre a p-bromobenzoato de escopoletina, o octanoato de escopoletina, a p-clorobenzoato de escopoletina e o p-metilbenzoato de escopoletina, os resultados sugerem que pequenas modificações na estrutura química da molécula estão associadas com alterações significativas no potencial antidepressivo do composto. De acordo com nossos resultados, Meotti *et al* (2006) mostrou modificações químicas na molécula de escopoletina proporcionaram uma alteração na propriedade antinociceptiva do composto. O benzoato de escopoletina foi duas vezes mais potente do que a escopoletina quanto à capacidade de neutralizar a resposta nociceptiva visceral, em camundongos, induzida pelo ácido acético (Meotti *et al.*, 2006). No presente estudo, portanto, como previamente mencionado, alterações na estrutura química da escopoletina foram muito mais efetivas em aumentar o efeito antidepressivo do composto.

A hipótese serotoninérgica da depressão (Głowski and Axelrod, 1964; Schildkraut, 1965) associou os sintomas depressivos com a redução da concentração de serotonina nas sinapses do encéfalo e, por outro lado, o mecanismo de ação antidepressiva com o aumento das concentrações desse neurotransmissor. Consistente com esta hipótese, a grande maioria dos fármacos utilizados atualmente para o tratamento da depressão aumentam os níveis sinápticos de serotonina (Risch e Nemeroff, 1992). Além disso, vale ressaltar que muitos extratos de plantas e compostos isolados desses extratos exibem efeito antidepressivo modulado pela via serotoninérgica (McGarry *et al.*, 2007; Machado *et al.*, 2007, 2008; Freitas *et al.*, 2010). Destaca-se o fato de que o efeito antidepressivo da escopoletina no TSC previamente demonstrado por nosso grupo é dependente do sistema serotoninérgico (Capra *et al.*, 2010). Considerando que o p-bromobenzoato de escopoletina tem 1.000.000 vezes mais potência do que a escopoletina, o presente estudo teve por objetivo investigar a contribuição da transmissão serotoninérgica no efeito antidepressivo de p-bromobenzoato de escopoletina. Para isto, os camundongos foram pré-tratados com PCPA, um inibidor da enzima triptofano hidroxilase, cuja administração, por quatro dias consecutivos, depleta os níveis endógenos de serotonina em cerca de 60% nestes animais, enquanto os níveis de noradrenalina e dopamina não são afetados (Redrobe *et al.*, 1998). A depleção de serotonina pelo PCPA não alterou o tempo de imobilidade no TSC, mas aboliu completamente a ação antidepressiva causada pela p-bromobenzoato de escopoletina. Além disso, um estudo prévio realizado por nosso grupo mostrou que o mesmo protocolo de tratamento com PCPA impediu totalmente o efeito antidepressivo da fluoxetina, mas não causou efeito sobre a ação da imipramina, um antidepressivo tricíclico inibidor da recaptação de serotonina e de noradrenalina, no TSC (Rodrigues *et al.*, 2002). Da mesma forma, O'Leary *et al.* (2007) mostraram que o pré-tratamento com PCPA, em camundongos, reverteu o efeito de diminuição do tempo de imobilidade induzido pela administração de fluoxetina e citalopram no TSC, mas não dos inibidores da recaptação de noradrenalina. Ainda, um trabalho de Eckeli *et al.* (2000) mostrou que o PCPA preveniu totalmente o efeito da fluoxetina, mas apenas parcialmente o efeito da imipramina no TNF. Portanto, nossos resultados sugerem que os efeitos do p-bromobenzoato de escopoletina requerem a disponibilidade de serotonina na fenda sináptica. Entretanto, os dados apresentados não nos permitem indicar precisamente o mecanismo pelo qual o p-bromobenzoato de escopoletina interfere com o sistema serotoninérgico, mas uma hipótese

é que ela inibe a recaptação da serotonina, aumentando a disponibilidade desse neurotransmissor na fenda sináptica. No entanto, futuros estudos são necessários para confirmar esta hipótese.

Atualmente, existem vários tratamentos para a depressão, dentre eles destacam-se os ISRSs. Os ISRSs são os antidepressivos mais prescritos em todo o mundo (Stahl, 2004). A descoberta desses agentes é um marco na neuropsicofarmacologia e no desenho racional de drogas (Vaswani *et al.*, 2003).

No entanto, um dos principais problemas na terapia antidepressiva com ISRSs é a eficácia limitada destes agentes. Alguns eventos adversos são atribuídos a tratamentos contínuos com ISRSs tais como fraqueza, fadiga, desconforto, não remissão dos sintomas, náusea, ejaculação precoce, insônia, diarreia, boca seca, sonolência e tonturas (Mattila *et al.*, 1988; Daly *et al.*, 2011).

Uma das estratégias mais utilizadas, desde a década de 20, no tratamento da depressão refratária (depressão não responsiva ao tratamento com antidepressivos clássicos) é a potenciação da terapia antidepressiva não efetiva por um segundo composto farmacológico com ou sem propriedades antidepressivas estabelecidas na literatura. Esta estratégia está sendo denominada de “augmentation” (Thase, 2007). Assim sendo, o termo “augmentation” é definido como a adição de um ou mais agentes farmacológicos a um tratamento antidepressivo pré-existente com o intuito de melhorar o humor dos pacientes e a resposta dos antidepressivos (DeBattista, 2006). Assim sendo, a prática clínica de combinar grupos ou substâncias farmacológicas com os ISRSs objetiva aumentar a eficácia e minimizar os efeitos colaterais destes antidepressivos. Embora estratégias de “augmentation” sejam amplamente baseadas em conhecimentos e experiências prévias, é necessário uma base neurofarmacológica sólida para suportar tais combinações. Poucos ensaios clínicos sistemáticos e controlados, comparando a terapia combinada com a monoterapia têm sido feitos. No presente estudo, o principal objetivo foi investigar o possível efeito tipo-antidepressivo da interação de doses sub-efetivas de diferentes ISRSs com a dose sub-efetiva da p-bromobenzoato de escopoletina administrada por via oral, dose que “per se” não produz efeito comportamental tipo-antidepressivo no TSC. Neste estudo, o efeito antidepressivo sinérgico da p-bromobenzoato de escopoletina com os ISRS fluoxetina, paroxetina e sertralina foram mostrados.

A fluoxetina, paroxetina e sertralina administradas em dose sub-efetivas tiveram seus efeitos antidepressivos no TSC potencializados por uma dose não efetiva de p-bromobenzoato de escopoletina (10^{-6} mg/kg,

p.o.). Acrescenta-se que este efeito não pode ser atribuído a uma alteração da atividade locomotora, tendo em vista que a combinação da p-bromobenzoato de escopoletina com estes antidepressivos foi desprovida de efeito significativo sobre a atividade locomotora dos camundongos no teste do campo aberto.

Este estudo, portanto, claramente mostrou o efeito tipo-antidepressivo do p-bromobenzoato de escopoletina em um modelo preditivo de ação antidepressiva no TSC em doses extremamente baixas. Além disso, a combinação terapêutica de p-bromobenzoato de escopoletina com doses sub-efetivas dos ISRS poderão, provavelmente, se constituir em uma alternativa ao tratamento convencional com estas drogas, em doses mais baixas, ao proporcionar um aumento na eficácia e possivelmente eliminar ou reduzir os efeitos colaterais indesejáveis que estas drogas apresentam quando utilizadas individualmente. Vale mencionar que os dados indicam que o efeito tipo-antidepressivo do p-bromobenzoato de escopoletina não está relacionado à atividade locomotora no TSC. No entanto, deve ser considerado que o TSC não é um modelo de depressão *per se* e os resultados obtidos nesse modelo devem ser interpretados com cautela. Dessa forma, os dados deste estudo podem servir como embasamento para a execução de estudos animais complementares bem como estudos clínicos, os quais podem confirmar o efeito antidepressivo do p-bromobenzoato de escopoletina.

7 CONCLUSÃO

O p-bromobenzoato de escopoletina apresentou um efeito tipo-antidepressivo no TSC em uma ampla faixa de doses muito baixas.

Os derivados semissintéticos da escopoletina: octanoato de escopoletina, p-metilbenzoato de escopoletina, p-clorobenzoato de escopoletina e p-bromobenzoato de escopoletina apresentaram efeito tipo-antidepressivo em camundongos submetidos ao TSC. Este efeito não é devido a uma ação psicoestimulante.

O pré-tratamento com PCPA preveniu o efeito tipo-antidepressivo do p-bromobenzoato de escopoletina sugerindo a participação do sistema serotoninérgico neste efeito.

Doses sub-efetivas de fluoxetina, paroxetina ou sertralina administradas em combinação com uma dose sub-efetiva de p-bromobenzoato de escopoletina, produziram um efeito tipo-antidepressivo no TSC, sem causar alteração na locomoção no TCA.

O p-bromobenzoato de escopoletina, derivado com maior atividade biológica, apresentou uma potência no efeito antidepressivo no TSC 1.000.000 vezes maior do que a demonstrada em estudos prévios pela escopoletina e pela fluoxetina (Capra *et al.*, 2010), sendo que este efeito é dependente da interação com o sistema serotoninérgico.

Os resultados sugerem que o p-bromobenzoato de escopoletina compartilha efeitos farmacológicos com os ISRS em nível pré-clínico.

PERSPECTIVAS

Verificar o efeito do tratamento crônico com p-bromobenzoato de escopoletina em camundongos nos seguintes parâmetros:

- a) Teste da suspensão pela cauda e teste do campo aberto
- b) Estresse crônico imprevisível
- c) Avaliações de sintomas neurológicos
- d) Análises toxicológicas
- e) Dosagens dos níveis de serotonina
- f) Verificação da liberação/captação de serotonina em preparações sinaptossomais

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKERELE O. Summary of WHO guidelines for the assessment of herbal medicines. *Herbal Gram.* 28: 13-19, 1993.
- AMERICAN PSYCHIATRY ASSOCIATION. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders. Washington, DC. 4th ed., 1994.
- AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. Mood Disorders. In: Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM-IV). Fourth Edition, Washington DC, 576 pp., 2000.
- BERTON O, NESTLER EJ. New approaches to antidepressant drug discovery: beyond monoamines. *Nat. Rev. Neurosci.* 7: 137-151, 2006.
- BINFARÉ RW, ROSA AO, LOBATO KR, SANTOS AR, RODRIGUES AL. Ascorbic acid administration produces an antidepressant-like effect: evidence for the involvement of monoaminergic neurotransmission. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 33(3):530-540, 2009.
- BORSINI F, MELI A. Is the forced swimming test a suitable model for revealing antidepressant activity? *Psychopharmacology (Berl).* 94(2):147-160, 1988.
- BOURIN M, CHENU F, RIPOLL N, DAVID DJP. A proposal of decision tree to screen putative antidepressants using forced swim and tail suspension tests. *Behav. Brain Res.* 164: 266-269, 2005.
- BRUNELLO N, MENDLEWICZ J, KASPER S, LEONARD B, MONTGOMERY S, NELSON J, PAYKEL E, VERSIANI M, RACAGNI G. The role of noradrenaline and selective noradrenaline reuptake inhibition in depression. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 12: 461-475, 2002.
- CALIXTO JB. Desenvolvimento de medicamentos: Ensaios pré-clínicos. *Médicos.* 22-25, 1998.
- CALIXTO JB. Efficacy, safety, quality, control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). *Braz J Med Biol Res.* 33: 179-189, 2000.
- CALIXTO JB. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America: a personal view. *J Ethnopharmacol.* 100(1-2):131-134, 2005.
- CAPRA JC, CUNHA MP, MACHADO DG, ZOMKOWSKI ADE, MENDES BG, SANTOS ARS, PIZZOLATTI MG, RODRIGUES ALS. Antidepressant-like effect of scopoletin, a coumarin isolated from *Polygala sabulosa* (Polygalaceae) in mice: Evidence for the involvement of monoaminergic systems. *Eur J Pharmacol.* 643: 232-238, 2010.

- CERVELLATI R, Innocenti G, Dall'Acqua S, Costa S, Sartini E. Polyphenols from *Polygala spp.* and their antioxidant activity. *Chem Biodivers.* 1(3): 415-425, 2004.
- CHUNG IW, MOORE NA, OH WK, O'NEILL MF, AHN JS, PARK JB, KANG UG, KIM YS. Behavioural pharmacology of polygala saponins indicates potential antipsychotic efficacy. *Pharmacol Biochem Behav.* 71(1-2): 191-195, 2002.
- CRYAN JF, MARKOU A, LUCKI I. Assessing antidepressant activity in rodents: recent developments and future needs. *Trends Pharmacol. Sci.* 23: 238-245, 2002.
- CRYAN JF, MOMBÉREAU C, VASSOUT A. The tail suspension test as a model for assessing antidepressant activity: review of pharmacological and genetic studies in mice. *Neurosci Biobehav Rev.* 29(4-5): 571-625, 2005.
- CUMMINGS JL. The neuroanatomy of depression. *J Clin Psychiatry.* 11: 14-20, 1993.
- CUNHA MP, MACHADO DG, BETTIO LEB, CAPRA JC, RODRIGUES ALS. Interaction of zinc with antidepressants in the tail suspension test. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 32:1913-1920, 2008.
- CYONG JC, KI SM, IJIMA K, KOBAYASHI T, FURUYA M. Clinical and pharmacological studies on liver diseases treated with Kampo herbal medicine. *Am J Chin Med.* 28: 351-360, 2000.
- DALY EJ, TRIVEDI MH, FAVA M, SHELTON R, WISNIEWSKI SR, MORRIS DW, STEGMAN D, PRESKORN SH, RUSH AJ. The relationship between adverse events during selective serotonin reuptake inhibitor treatment for major depressive disorder and nonremission in the suicide assessment methodology study. *J Clin Psychopharmacol.* 31(1):31-38, 2011.
- DEBATTISTA C. Augmentation and combination strategies for depression. *J Psychopharmacol.* 20(3): 11-18, 2006.
- DING Z, DAI Y, WANG Z. Hypouricemic action of scopoletin arising from xanthine oxidase inhibition and uricosuric activity. *Planta Med.* 71(2): 183-185, 2005.
- EBMEIER KP, DONAGHEY C, STEELE JC. Recent developments and current controversies in depression. *Lancet* 367:153-167, 2006.
- ECKELI AL, DACH F, RODRIGUES AL. Acute treatments with GMP produce antidepressant-like effects in mice. *Neuroreport.* 11(9): 1839-1843, 2000.

- ELHWUEGI AS. Central monoamines and their role in major depression. *Prog Neuro-Psychopharmacol Biol Psychiatry*. 28: 435-451, 2004.
- ELISABETSKY E, WANNMACHER L. The status of ethnopharmacology in Brazil. *J Ethnopharmacol*. 38: 137-143, 1993.
- FARINA M, FRANCO JL, RIBAS CM, MEOTTI FC, MISSAU FC, PIZZOLATTI MG, DAFRE AL, SANTOS AR. Protective effects of *Polygala paniculata* extract against methylmercury-induced neurotoxicity in mice. *J Pharm Pharmacol*. 57: 1503-1508, 2005.
- FILE SE. Recent developments in anxiety, stress, and depression. *Pharmacol Biochem Behav*. 54: 3-12, 1996.
- FLECK MPA, LAFER B, SOUGEY EB, PORTO JA, BRASIL MA, JURUENA MF. Diretrizes da Associação Médica Brasileira para o tratamento da depressão (versão integral). *Rev Bras Psiquiatr*. 25: 114-122, 2003.
- FRANCO JL, BRAGA HC, STRINGARI J, MISSAU FC, POSSER T, MENDES BG, LEAL RB, SANTOS AR, DAFRE AL, PIZZOLATTI MG, FARINA M. Mercurial-induced hydrogen peroxide generation in mouse brain mitochondria: protective effects of quercetin. *Chem Res Toxicol* 20 (12): 1919-1926, 2007.
- FREITAS AE, BUDNI J, LOBATO KR, BINFARÉ RW, MACHADO DG, JACINTO J, VERONEZI PO, PIZZOLATTI MG, RODRIGUES AL. Antidepressant-like action of the ethanolic extract from *Tabebuia avellanedae* in mice: evidence for the involvement of the monoaminergic system. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 34(2): 335-343, 2010.
- FURNESS SH, STAFFORD PJ. Polygalaceae. *Rev Palaeobot Palynol*. 88: 61-82, 1995.
- GLOWINSKI J, AXELROD J. Inhibition of Uptake of Tritiated-noradrenaline in the Intact Rat Brain by Imipramine and Structurally Related Compounds. *Nature*. 204: 1318-1319, 1964.
- HA WY, WU PK, KOK TW, LEUNG KW, MAK NK, YUE PY, NGAI SM, TSAI SN, WONG RN. Involvement of protein kinase C and E2F-5 in euxanthone-induced neurite differentiation of neuroblastoma. *Int J Biochem Cell Biol*. 38:1393-1401, 2006.
- HANSCH C. *Drug Design I*, ARIENS E J. Ed., Academic Press, New York and London. 271, 1971.
- IKEDA R, WADA M, NISHIGAKI T, NAKASHIMA K. Quantification of coumarin derivatives in Noni (*Morinda citrifolia*) and their contribution of quenching effect on reactive oxygen species. *Food Chemistry*. 113: 1169-1172, 2009.

- KASTER MP, SANTOS ARS, RODRIGUES ALS. Involvement of 5-HT_{1A} receptors in the antidepressant-like effect of adenosine in the mouse forced swimming test. *Brain Res Bull.* 67: 53-61, 2005.
- KAWASHIMA K, MIYAKO D, ISHINO Y, MAKINO T, SAITO K, KANO Y. Anti-stress effects of 3,4,5-trimethoxycinnamic acid, an active constituent of roots of *Polygala tenuifolia* (Onji). *Biol Pharm Bull.* 27(8): 1317-1379, 2004.
- KESSLER RC, MCGONAGLE KA, ZHAO S, NELSON CB, HUGHES M, ESHLEMAN S. Lifetime and 12-month prevalence of DSM-III-R psychiatric disorders in the United States. *Arch Gen Psychiatry* 51: 8-19, 1994.
- KIM HJ, JANG SI, KIM YJ, CHUNG HT, YUN YG, KANG TH, JEONG OS, KIM YC. Scopoletin suppresses pro-inflammatory cytokines and PGE₂ from LPS-stimulated cell line, RAW 264.7 cells. *Fitoterapia.* 75 (3-4): 261-266, 2004.
- KOROLKOVAS A. Planejamento de Fármacos/ Drug Desing. 6 ed. São Paulo: *Ciência e Cultura* 41: 528, 1989.
- KOROLKOVAS A, FERREIRA EI. Planejamento racional de fármacos. *Quím. Nova* 11(2): 320-329, 1988.
- KOU J, SI M, DAI G, LIN Y, ZHU D. Antiinflammatory activity of *Polygala japonica* extract. *Fitoterapia.* 77(6): 411-5, 2006.
- LAPA AJ, SOUCCAR C, LIMA-LANDMAN MTR, GODINHO RO, DE LIMA TCM. Farmacologia e toxicologia de produtos naturais. In: Farmacognosia: da planta ao medicamento/Organizado por SIMÕES CMO, SCHENKEL EP, GOSMANN G, MELLO JCP, MENTZ LA, PETROVICK PR. Porto Alegre/Florianópolis: ed. Universidade/UFRGS/ed. UFSC, 181-196, 1999.
- LEVINSON DF. The genetics of depression: A review. *Biol Psychiatry.* 60: 84-92, 2006.
- LI C, YANG J, YU S, CHEN N, XUE W, HU J, ZHANG D. Triterpenoid saponins with neuroprotective effects from the roots of *Polygala tenuifolia*. *Planta Med.* 74 (2): 133-141, 2008.
- LIN HC, TSAI SH, CHEN CS, CHANG YC, LEE CM, LAI ZY, LIN CM. Structure-activity relationship of coumarin derivatives on xanthine oxidase-inhibiting and free radical-scavenging activities. *Biochem Pharmacol.* 75 (6): 1416-1425, 2008.
- LIU XL, ZHANG L, FU XL, CHEN K, QIAN BC. Effect of scopoletin on PC3 cell proliferation and apoptosis, *Acta Pharmacol Sin.* 22 (10): 929-933, 2001.
- LUDTKE R, BOLDRINI II, MIOTTO STS. A new species of *Polygala* (Polygalaceae) from southern Brazil. *Kew Bulletin.* 63: 665-667, 2008.

- LUDTKE R. O gênero *Polygala* L. (Polygalaceae) no Rio Grande do Sul, Brasil. 2004. 164 f. Dissertação (Mestrado em Botânica), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 2004.
- MACGILLIVRAY S, ARROLL B, HATCHER S, OGSTON S, REID I, SULLIVAN F, WILLIAMS B, CROMBIE I. Efficacy and tolerability of selective serotonin reuptake inhibitors compared with tricyclic antidepressants in depression treated in primary care: systematic review and meta-analysis. *B M J*. 326: 1014-1020, 2003.
- MACHADO DG, BETTIO LE, CUNHA MP, SANTOS AR, PIZZOLATTI MG, BRIGHENTE IM, RODRIGUES AL. Antidepressant-like effect of rutin isolated from the ethanolic extract from *Schinus molle* L. in mice: evidence for the involvement of the serotonergic and noradrenergic systems. *Eur J Pharmacol*. 587(1-3):163-168, 2008.
- MACHADO DG, BETTIO LE, CUNHA MP, CAPRA JC, DALMARCO JB, PIZZOLATTI MG, RODRIGUES AL. Antidepressant-like effect of the extract of *Rosmarinus officinalis* in mice: involvement of the monoaminergic system. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 33(4): 642-50, 2009.
- MACHADO DG, KASTER MP, BINFARÉ RW, DIAS M, SANTOS ARS, PIZZOLATTI MG, BRIGHENTE IM, RODRIGUES ALS. Antidepressant-like effect of the extract from leaves of *Schinus molle* L. in mice: evidence for the involvement of the monoaminergic system. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 31: 421-428, 2007.
- MAK NK, LUNG HL, WONG RN, LEUNG HW, TSANG HY, LEUNG KN. Expression of protein kinase C isoforms in euxanthone-induced differentiation of neuroblastoma cells. *Planta Med*. 67: 400-405, 2001.
- MANTOVANI M, PÉRTILE R, CALIXTO JB, SANTOS ARS, RODRIGUES ALS. Melatonin exerts an antidepressant-like effect in the tail suspension test in mice: evidence for involvement of N-methyl-D-aspartate receptors and the L-arginine-nitric oxide pathway. *Neurosci Lett*. 343: 1-4, 2003.
- MARQUES MCM, PEIXOTO AL. Estudo taxonômico de *Polygala* subgênero *Ligustrina* (Chodat) Paiva (Polygalaceae). *Rodriguésia* 58(1):95-146, 2007.
- MATTILA MJ, SAARIALHO-KERE U, MATTILA M. Acute effects of sertraline, amitriptyline, and placebo on the psychomotor performance of healthy subjects over 50 years of age. *J Clin Psychiatry*. 49: 52-58, 1988.

- MCARTHUR R, BORSINI F. Animal models of depression in drug discovery: A historical perspective. *Pharmacol Biochem Behav.* 84: 436-452, 2006.
- MCGARRY H, PIROTTA M, HEGARTY K, GUNN J. General practitioners and St. John's Wort: a question of regulation or knowledge? *Complement Ther Med.* 15(2):142-8, 2007.
- MENDES BG. *Polygala sabulosa* A. W. Bennett: obtenção de estilipironas e cumarinas, preparo de análogos e ensaios de atividades biológicas. 2008. 192 f. Tese (Doutorado em Química), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 2008.
- MEOTTI FC, ARDENGHI JV, PRETTO JB, SOUZA MM, D'AVILA JM, JUNIOR AC, SOLDI C, PIZZOLATTI MG, SANTOS AR. Antinociceptive properties of coumarins, steroid and dihydristyryl-2-pyrone from *Polygala sabulosa* (Polygalaceae) in mice. *J Pharm Pharmacol.* 58(1):107-112. 2006.
- NARDI AE. Depressão no ciclo da vida. *Rev Bras Psiquiatr.* 22: 149-152, 2000
- NEMEROFF CB. The burden of severe depression: A review of diagnostic challenges and treatment alternatives. *J Psychiatr Res.* 41: 189-206, 2007.
- NEMEROFF CB, OWENS MJ. Treatment of mood disorders. *Nat Neurosci.* 5: 1068-1070, 2002.
- NESTLER EJ, BARROT M, DILEONE RJ, EISCH AJ, GOLD SJ, MONTEGGIA LM. Neurobiology of depression. *Neuron* 34: 13-25, 2002.
- NESTLER EJ, CARLEZON WA. The mesolimbic dopamine reward circuit in depression. *Biol Psychiatry.* 59: 1151-1159, 2006.
- O'LEARY OF, BECHTHOLT AJ, CROWLEY JJ, HILL TE, PAGE ME, LUCKI I. Depletion of serotonin and catecholamines block the acute behavioral response to different classes of antidepressant drugs in the mouse tail suspension test. *Psychopharmacology (Berl).* 192(3): 357-371, 2007.
- ORHAN I, TOSUN F, SENER B. Coumarin, anthroquinone and stilbene derivatives with anticholinesterase activity. *Z Naturforsch.* 63 (5-6): 366-370, 2008.
- PANDA S, KAR A. Evaluation of the antithyroid, antioxidative and antihyperglycemic activity of scopoletin from *Aegle marmelos* leaves in hyperthyroid rats. *Phytother Res.* 20(12):1103-1105, 2006.
- PIZZOLATTI MG, KOGA AH, GRISARD EC, STEINDEL M. Tripanocidal activity of extract from Brazilian Atlantic Rain Forest plant species. *Phytomedicine.* 10: 422-426, 2003.

- PORSOLT RD, LE PICHON M, JALFRE M. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature* 266: 730–732, 1977.
- POSSER T, KASTER MP, BARAÚNA SC, ROCHA JB, RODRIGUES AL, LEAL RB. Antidepressant-like effect of the organoselenium compound ebselen in mice: evidence for the involvement of the monoaminergic system. *Eur J Pharmacol.* 602(1): 85-89, 2009.
- REDROBE JP, BOURIN M, COLOMBEL MC, BAKER GB. Dose-dependent noradrenergic and serotonergic properties of venlafaxine in animal models indicative of antidepressant activity. *Psychopharmacology (Berl)*. 138(1): 1-8, 1998.
- RIBAS CM, MEOTTI FC, NASCIMENTO FP, JACQUES AV, DAFRE AL, RODRIGUES ALS, FARINA M, SOLDI C, MENDES B, PIZZOLATTI MG, SANTOS ARS. Antinociceptive effect of the *Polygala sabulosa* hydroalcoholic extract in mice: Evidence for the involvement of glutamatergic receptors and cytokines pathways. *Basic Clinical Pharmacol Toxicol.* 103: 43-47, 2008.
- RISCH SC, NEMEROFF CB. Neurochemical alterations of serotonergic neuronal systems in depression. *J Clin Psychiatry.* 53:3-7, 1992.
- RODRIGUES ALS, ROCHA JBT, MELLO CF, SOUZA DO. Effect of perinatal lead exposure on rat behavior in open-field and two-way avoidance tasks. *Pharmacol Toxicol.* 79: 150-156, 1996.
- RODRIGUES ALS, SILVA GL, MATTEUSSI AS, FERNANDES E, MIGUEL O, YUNES RA, SANTOS ARS, CALIXTO JB. Involvement of monoaminergic system in the antidepressant-like effect of the hydroalcoholic extract of *Siphocampylus verticillatus*. *Life Sci* 70: 1347-1358, 2002.
- SAIRAM KVVM, KHAR RK, MUKHERJEE R, JAIN SK. Three dimensional pharmacophore modelling of monoamine oxidase-A (MAO-A) inhibitors. *Int J Mol Sci.* 8 (9): 894-919, 2007.
- SCHILDKRAUT JJ. The catecholamine hypothesis of affective disorders: a review of supporting evidence. *Am J Psychiatry.* 122: 509-522, 1965.
- SHIN EJ, OH KW, KIM KW, KWON YS, JHOO JH, JHOO WK, CHA JY, LIM YK, KIM IS, KIM HC. Attenuation of cocaine-induced conditioned place preference by *Polygala tenuifolia* root extract. *Life Sci.* 75(23): 2751-2764, 2004.
- SIDDIQUI BS, SATTAR FA, AHMAD F, BEGUM S. Isolation and structural elucidation of chemical constituents from the fruits of *Morinda citrifolia* Linn. *Arch Pharm Res.* 30(8): 919-923, 2007.

- SIMON GE, MAIER W, USTUN TB, LINDEN M, BOYER P. Research diagnosis of current depressive disorder: a comparison of methods using current symptoms and lifetime history. *J. Psychiatry Res.* 29: 457-465, 1995.
- STAHL SM. Drug combinations for bipolar spectrum disorders: evidence-based prescribing or prescribing-based evidence? *J Clin Psychiatry.* 65(10): 1298-1299, 2004.
- STERU L, CHERMAT R, THIERRY B, SIMON P. The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. *Psychopharmacology.* 85: 367-370, 1985.
- TENG CT, HUMES EC, DEMETRIO FN. Depressão e comorbidade clínicas. *Rev Psiquiatr Clín.* 32: 149-159, 2005.
- THASE ME. Augmentation strategies for depression: history and concepts. *CNS Spectr.* 12(22): 3-5, 2007.
- THIERRY B, STERU L, SIMON P, PORSOLT RD. The tail suspension test: ethical considerations. *Psychopharmacology.* 90: 284-285, 1986.
- VASWANI M, LINDA FK, RAMESH S. Role of selective serotonin reuptake inhibitors in psychiatric disorders: a comprehensive review. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 27(1): 85-102, 2003.
- WANG H, GAO J, KOU J, ZHU D, YU B. Anti-inflammatory activities of triterpenoid saponins from *Polygala japonica*. *Phytomedicine.* 15(5): 321-326, 2008.
- WASICKY R. Anais da Faculdade de Farmácia e Odontologia da Universidade de São Paulo, vol. 4, São Paulo, p. 179, 1945.
- WONG M, LICICIO J. Research and treatment approaches to depression. *Nat Rev Neurosci.* 2: 343-351, 2001.
- WURDACK JJ, SMITH LB. Flora Ilustrada Catarinense. Polygalaceae. *Itajaí: Tipografia e Livraria Blumenauense S.A.* 3-52, 1971.
- YABE T, TUCHIDA H, KIYOHARA H, TAKEDA T, YAMADA H. Induction of NGF synthesis in astrocytes by onjisaponins of *Polygala tenuifolia*, constituents of kampo (Japanese herbal) medicine, Ninjin-yoei-to. *Phytomedicine.* 10(2-3): 106-114, 2003.
- YUNES RA, FILHO VC. Estratégias for obtaining Pharmacologically Active Compounds From Medicinal Plants. Concepts about Structural Modification for Improve The Activity. *Quím. Nova.* 21:1, 1998.