

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS**

Ana Lúcia Bertarello Zeni

**ESTUDO FITOQUÍMICO, TOXICOLÓGICO E DOS EFEITOS  
NEUROPROTETOR E TIPO ANTIDEPRESSIVO DO EXTRATO  
AQUOSO DE *ALOYSIA GRATISSIMA* (GILL et HOOK)  
TRONCOSO (ERVA SANTA)**

Tese submetida ao Programa de Pós  
Graduação em Neurociências, na área  
de Neurobiologia Celular e Molecular  
do Centro de Ciências Biológicas da  
Universidade Federal de Santa  
Catarina, para a obtenção do Grau de  
Doutor em Neurociências.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Carla Inês  
Tasca

Co-Orientador: Prof. Dr. Marcelo  
Maraschin

Florianópolis

2011

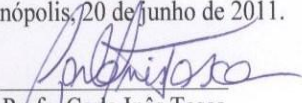


ANA LÚCIA BERTARELLO ZENI

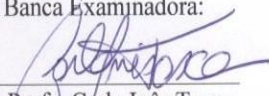
**“ESTUDO FITOQUÍMICO, TOXICOLÓGICO E DOS  
EFEITOS NEUROPROTETOR E TIPO  
ANTIDEPRESSIVO DO EXTRATO AQUOSO DE  
ALOYSIA GRATISSIMA (Gill et Hook) TRONCOSO (Erva  
Santa)”.**

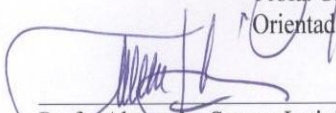
Esta tese foi julgada e aprovada para a obtenção do Grau de  
Doutor em Neurociências na área de Neurobiologia Celular e  
Molecular no Programa de Pós-Graduação em Neurociências da  
Universidade Federal de Santa Catarina

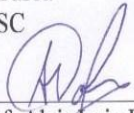
Florianópolis, 20 de junho de 2011.

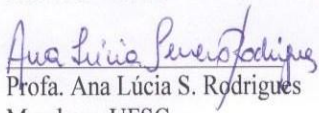
  
\_\_\_\_\_  
Prof. Carla Inês Tasca  
Coordenadora do Curso

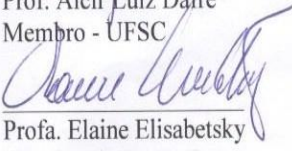
Banca Examinadora:

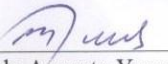
  
\_\_\_\_\_  
Prof. Carla Inês Tasca  
Orientadora – UFSC

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Alexandra Susana Latini  
Membro - UFSC

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Alcir Luiz Dafré  
Membro - UFSC

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Ana Lúcia S. Rodrigues  
Membro - UFSC

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Elaine Elisabetsky  
Membro da Banca Externo

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Rosendo Augusto Yunes  
Membro da Banca Externo



“The question for the new millennium is whether, when we have never been better poised technologically to evaluate natural products, these advances will occur fast enough to overtake the current rates of plant extinction and indigenous culture loss. Will tribal knowledge survive this millennium? If it doesn't, the world will be far poorer for its loss” (Cox, 2000).

## AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus, pois é impossível entender este mundo maravilhoso sem pensar na existência Dele;

À minha família e principalmente ao meu marido, Heraldo aos meus filhos Francielle e Alexandre, por entenderem as minhas ausências e as “ausências” mesmo eu estando corpo presente;

Aos meus pais, pela grandeza de sempre terem me deixado livre para fazer as minhas escolhas e hoje criando os meus filhos eu sei o quanto isto deve ter sido difícil;

À D. Maria, moradora de Guabiruba, que demorou a entender o que eu fazia no quintal da casa dela, “catando mato”;

À FURB, pela licença remunerada, que possibilitou o desenvolvimento desta tese;

À minha orientadora, Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Carla I. Tasca, pela oportunidade de, entrar no mundo da neurociência, desenvolvendo um estudo utilizando extrato de planta e também, pela paciência e credibilidade em meu trabalho. Quase tudo o que pensamos ser possível de fazer se tornou realidade.

Ao pessoal do laboratório de neuroquímica 4, Tharine, sempre disposta a desafios, Samuel, Wagner, Simone por me acolherem, dividindo conhecimento, trabalho, preocupações, brincadeiras e amizade, jamais esquecerei de vocês. Também a Dani, Adalberto, Bárbara e, Bruno, Tet e Sarah que já saíram do lab, um pedacinho de cada um de vocês está neste trabalho. A todos por me aturarem meio coelho maluco, sempre de olho no relógio. E aos mais novos integrantes do lab, a Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Claudia e a Paula, foi um prazer conhecê-las;

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Marcelo Maraschin, que abriu as portas de seu laboratório, sem nunca duvidar de que daria tudo certo, sempre incentivando a seguir em frente e pensar além, certamente fui mais longe do que imaginava. A Aloysia se mostrou uma grata recompensa, como você sempre falou.

Ao pessoal do laboratório de morfogênese vegetal, principalmente a Priscilla e a Fernanda pelo auxílio em algumas técnicas fitoquímicas;

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Edna Amante pelo intenso uso de seu laboratório e principalmente o espectrofotômetro;

Às minhas companheiras de assuntos fitoquímicos, Rossana e Cristiane, que bela jornada fizemos juntas, formando também uma amizade, já estou com saudades;

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Thereza C. M. de Lima, por aceitar fazer parte da banca de qualificação e deste trabalho juntamente com o Dr. Filipe Duarte e Dr<sup>a</sup>. Claudia Figueiredo e Prof<sup>a</sup>. Claudia Coelho Almeida de Albuquerque, no desenvolvimento da etapa de toxicidade;

A Andréa, pelo trabalho juntas, compartilhando, conhecimento, experiências e amizade.

A Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana L.S. Rodrigues, por fazer parte da banca de qualificação, acreditar no potencial deste trabalho e naturalmente se tornar mentora de parte dele por intermédio da Andréa;

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Alessandra Latini por fazer parte da banca de qualificação e pelos conselhos e ao Filipe Gonçalves, pelo auxílio na etapa de verificação da peroxidação lipídica;

Ao Prof. Dr. Adair Roberto Soares dos Santos por fazer parte da banca de qualificação;

À todos os professores do curso de Neurociências, tenham a certeza de que o trabalho de vocês fará parte da história de cada aluno que passa no curso, assim como acontece comigo;

Ao Nivaldo, pela tranquilidade e bom humor, atendendo sempre com paciência a todos que lhe procuram e a Jo e a todos que trabalham no biotério central com organização e respeito aos animais, eles merecem.



## RESUMO

Zeni, Ana Lúcia Bertarello. **Estudo fitoquímico, toxicológico e dos efeitos neuroprotetor e tipo antidepressivo do extrato aquoso de *Aloysia gratissima* (Gill et Hook) Troncoso (erva santa)**. 2011. Tese (Doutorado em Neurociências) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

*Aloysia gratissima* é uma planta utilizada para tratar sintomas de doenças relacionadas principalmente aos sistemas respiratório e, nervoso central, no Brasil, Argentina, Paraguai e Uruguai. Seu uso popular não vem sendo acompanhado por estudos científicos que poderiam garantir um uso com qualidade, eficácia e segurança. Neste estudo foi investigado o perfil sazonal metabólico do extrato aquoso de *Aloysia gratissima* (EA) e identificados e quantificados compostos fenólicos (ácido ferúlico, trans-cinâmico e ácido p-cumárico) e carotenóidicos (luteína e trans- $\beta$ -caroteno) majoritários, conhecidos pela capacidade antioxidante. A avaliação de toxicidade aguda revelou um uso seguro de EA abaixo de 2000 mg/kg em camundongos. Foram evidenciados os efeitos: antioxidante, neuroprotetor frente à excitotoxicidade glutamatérgica e tipo antidepressivo. Os estudos dos mecanismos envolvidos no efeito neuroprotetor do EA demonstraram o envolvimento de modulação do transporte de glutamato, ativação da via PI3K, diminuição da expressão de iNOS e antagonismo ao receptor NMDA. EA não preveniu o surgimento de convulsões induzidas pelo ácido quinolínico, no entanto foi evidenciado um efeito neuroprotetor através da modulação do transporte de glutamato. A participação do receptor NMDA, da via L-arginina-NO-cGMP e do sistema monoaminérgico foram evidenciados no efeito tipo antidepressivo do EA. O composto majoritário do EA, ácido ferúlico, exerceu um efeito tipo antidepressivo em camundongos, sugerindo a participação do sistema serotoninérgico neste efeito. Desta forma, o EA e o ácido ferúlico demonstraram seu potencial na prevenção ou tratamento de doenças que envolvem os sistemas, serotoninérgico e glutamatérgico.

**Palavras-chave:** *Aloysia gratissima*, neuroproteção, tipo antidepressivo, sistema glutamatérgico e serotoninérgico.

## ABSTRACT

Zeni, Ana Lúcia Bertarello. **Phytochemistry, toxicology, neuroprotective and antidepressant-like effects of aqueous extract of *Aloysia gratissima* (Gill et Hook) Troncoso (erva santa) study.** 2011. Thesis (Doctorate in Neuroscience) – Federal of Santa Catarina University, Florianópolis, Brazil.

*Aloysia gratissima* is a plant used to treat symptoms mainly related to the respiratory and central nervous systems in Brazil, Argentina, Paraguay, and Uruguay. It's popular use has not been accompanied by scientific studies that could provide a contribution to quality, efficacy, and safety. Our study showed a seasonal metabolic profile of *Aloysia gratissima*'s aqueous extract (AE), which major phenolic (ferulic acid, *trans*-cinnamic, and *p*-coumaric acid) and carotenoid (lutein and *trans*- $\beta$ -carotene) compounds were identified and quantified. These compounds are known for their antioxidant capacity. Acute toxicity evaluation of AE in mice demonstrated to be safe in doses below 2000 mg/kg. Our data suggest that AE exerts biological effects such as antioxidant, neuroprotective against the glutamatergic excitotoxicity and antidepressant-like activity. The neuroprotective effect of AE against glutamatergic excitotoxicity involved glutamate transport modulation, PI3K pathway activation, decreasing iNOS expression and possible NMDA receptor antagonism. Although AE did not protect animals against quinolinic acid-induced seizures, it showed neuroprotective effect by glutamate transport modulation. The involvement of NMDA receptor, L-arginine-NO-cGMP pathway, and monoaminergic system were evidenced in the antidepressant-like effect of AE. The major component of AE, ferulic acid, was also able to exert antidepressant-like effect in mice. Serotonergic system participation and a synergistic activity with conventional antidepressants were demonstrated in this effect. Thus, AE and ferulic acid showed their potential use in preventing or treating diseases that involves glutamatergic and serotonergic systems.

**Keywords:** *Aloysia gratissima*, neuroprotection, antidepressant-like, glutamatergic and serotonergic systems.

## APRESENTAÇÃO

Esta Tese de Doutorado encontra-se organizada da seguinte forma:

A Introdução contém o embasamento teórico do problema apresentado, a justificativa e os objetivos desenvolvidos durante o desenvolvimento desta tese.

Os capítulos contêm os materiais e métodos, os resultados e as discussões, bem como as referências específicas de cada assunto tratado, apresentados na forma de artigos científicos.

A discussão geral apresenta a integração de todos os estudos realizados.

A seção de referências apresenta as referências citadas na introdução e discussão.

Desenvolvimento dos capítulos pertencentes a esta tese:

O capítulo 1 (artigo 1) foi desenvolvido nos departamentos de Fitotecnia e Bioquímica-UFSC, com a colaboração dos Profs. Dr. Marcelo Maraschin e Prof<sup>a</sup> Dr. Alexandra Latini. O capítulo 2 (artigo 2) foi desenvolvido no Departamento de Farmacologia-UFSC e Departamento de Ciências Naturais-FURB, com a colaboração das Prof<sup>as</sup>. Thereza C.M. de Lima e Claudia C.A. de Albuquerque. Os demais capítulos (artigos 3-8) foram desenvolvidos no Departamento de Bioquímica-UFSC sob coordenação da Prof<sup>a</sup> Dr. Carla I. Tasca e colaboração da Prof<sup>a</sup> Dr. Ana L.S. Rodrigues.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> -Fotografia de <i>Aloysia gratissima</i> .....	21
<b>Figura 2</b> -Excitotoxicidade glutamatérgica.....	25
<b>Figura3</b> -Moléculas de origem vegetal (MOV), efeito antioxidante ou sinalizador?.....	26
<b>Figura 4</b> -Efeitos biológicos do extrato aquoso de <i>Aloysia gratissima</i>	215
<b>Figura 5</b> -Efeito tipo antidepressivo do ácido ferúlico.....	216

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-HT: 5- hidróxitriptamina - serotonina  
AF: ácido ferúlico  
Akt/PKB: proteína cinase B  
AMPc: adenosina monofosfato cíclico  
AMPA: alfa-amino-3-hidróxi-metilsoxazol-propionato  
AQ: ácido quinolínico  
ATP: adenosina trifosfato  
BDNF: fator neurotrófico derivado do cérebro  
Ca<sup>2+</sup>: íon cálcio  
CREB: fator responsivo ao elemento AMPc  
DA: doença de Alzheimer  
DMSO: dimetil sulfóxido  
DPPH: difenilpicrilidrazil  
EA: extrato aquoso de *Aloysia gratissima*  
EAAT: transportador de aminoácidos excitatórios  
ERK: proteína cinase regulada por sinal extracelular  
EROs: espécies reativas de oxigênio  
GLT-1: transportador de glutamato 1  
GMPc: guanosina monofosfato cíclico  
ISRS: inibidor seletivo de recaptção de serotonina  
LDH: lactato desidrogenase  
LY 294002: [2-4(-morfolinil)-8-fenil-1-(4H)-benzopiran-4-1-  
hidrocloro]

MAPK: proteína cinase ativada por mitógenos  
MK-801: dizocilpina  
Na<sup>+</sup>: íon sódio  
NMDA: N-metil-D-aspartato  
NO: óxido nítrico  
NOS: sintase do óxido nítrico  
OMS: organização mundial da saúde  
PDE: fosfodiesterase  
PGO: privação de glicose e oxigênio  
PI3K: proteína cinase de 3-fosfatidilinositol  
PIP2: fosfatidilinositol-3,4-bisfosfato  
PIP3: fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato  
PKC: proteína cinase C  
PNSI: parque nacional da serra do Itajaí  
sGC: guanilato ciclase solúvel

SNC: sistema nervoso central

TBARS: espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico

TNF: teste do nado forçado

TSC: teste de suspensão da cauda

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>17</b>
1.1 O USO DE PLANTAS COM FINS TERAPÊUTICOS.....	17
1.2 AS PLANTAS MEDICINAIS E O SISTEMA NERVOSO CENTRAL.....	18
1.3 <i>ALOYSIA GRATISSIMA</i> (GILLIES et HOOK.) TRONCOSO.....	20
1.4 TRANSMISSÃO E EXCITOTOXICIDADE GLUTAMATÉRGICA.....	23
1.5 DOENÇAS NEURODEGENERATIVAS.....	26
1.5.1A Depressão.....	26
1.5.2A Epilepsia.....	28
1.6 VIAS DE SINALIZAÇÃO E A SOBREVIVÊNCIA CELULAR.....	29
<b>1.7 JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>30</b>
<b>1.8 OBJETIVOS.....</b>	<b>31</b>
1.8.1Objetivo Geral.....	31
1.8.2Objetivos Específicos.....	31
 <b>CAPÍTULO 1 - Polyphenolic and carotenoidic seasonal profile and bioactivity of the <i>Aloysia gratissima</i> (Verbenaceae).....</b>	 <b>33</b>
 <b>CAPÍTULO 2 - Acute toxicological evaluation of the traditional medicine <i>Aloysia gratissima</i> (Gill et Hook) Tronc. in mice .....</b>	 <b>63</b>
 <b>CAPÍTULO 3 - Neuroprotective effects of <i>Aloysia gratissima</i> aqueous extract against glutamate excitotoxicity in rat hippocampal slices .....</b>	 <b>82</b>
 <b>CAPÍTULO 4 - <i>Aloysia gratissima</i> prevents cellular damage induced by quinolinic acid in mice hippocampus by modulation of glutamate transport .....</b>	 <b>106</b>
 <b>CAPÍTULO 5 - Antidepressant-like and neuroprotective effects of <i>Aloysia gratissima</i>: investigation of involvement of L-arginine-nitric oxide-cyclic guanosine monophosphate pathway.....</b>	 <b>128</b>

<b>CAPÍTULO 6</b> - Evidence of the involvement of the monoaminergic system in the antidepressant-like effect of <i>Aloysia gratissima</i> .....	139
<b>CAPÍTULO 7</b> - Ferulic acid exerts antidepressant-like effect in the tail suspension test in mice: evidence for the involvement of the serotonergic system.....	160
<b>CAPÍTULO 8</b> - Involvement of PKA, CaMKII, PKC, MAPK/ERK and PI3K in the acute antidepressant-like effect of ferulic acid in the tail suspension test .....	185
<b>2 DISCUSSÃO GERAL</b> .....	205
2.1 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	214
<b>3 CONCLUSÕES</b> .....	217
<b>4 PERSPECTIVAS</b> .....	218
<b>5 REFERÊNCIAS</b> .....	219



# **1 INTRODUÇÃO**

## **1.1 O USO DE PLANTAS COM FINS TERAPÊUTICOS**

As plantas medicinais têm sido usadas por diversas civilizações no tratamento de afecções que afligem o ser humano, consistindo numa importante fonte de compostos com propriedades terapêuticas. Índia, China e Japão já utilizavam extratos vegetais com fins terapêuticos antes de Cristo e, na Europa medieval, existem registros do uso de extratos vegetais que se estendem até o século XIX (Schenkel et al., 2001). No início do século XIX, como resultado das frequentes intoxicações derivadas da administração desses extratos, foram criados órgãos públicos para organizar e regulamentar a comercialização dos mesmos. Naquela época foram iniciados estudos de purificação, isolamento e testes para atividades farmacológicas de compostos derivados de extratos brutos (Schenkel et al., 2001).

No início do século XX poucos extratos brutos eram investigados, havendo uma tendência de substituição destes por compostos isolados ou sintéticos (Lapa et al., 2001). No entanto, empresas farmacêuticas têm demonstrado que para algumas doenças complexas, produtos naturais representam uma fonte a ser investigada visando a produção de novos compostos químicos, pois possuem estruturas moleculares selecionadas pela evolução através de milhares de anos (Newman et al., 2003; Boldi, 2004; Clardy & Walsh, 2004; Koehn & Carter, 2005). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS, 2002), aproximadamente 25% dos medicamentos considerados essenciais são originários de produtos naturais, sendo 11% destes oriundos exclusivamente de plantas. Conforme Elisabetsky (2000), a maioria dos medicamentos usados derivados de plantas foi descoberta como resultado de pesquisas científicas com plantas conhecidas, utilizadas na medicina tradicional.

Nas últimas décadas estudos com extratos de plantas obtiveram um novo impulso devido a alguns fatores, mas principalmente as condições sócio-econômicas das populações, pois, segundo a OMS, 65–80% da população mundial em países em desenvolvimento, pela escassez ou falta de acesso à medicina moderna, depende principalmente das plantas para cuidados primários de saúde, considerando neste caso a fitoterapia como parte do seu programa básico de saúde. No Brasil, o governo federal aprovou a Política Nacional de Plantas Medicinais e

Fitoterápicos, por meio do Decreto Presidencial Nº. 5.813, de 22 de junho de 2006. Atualmente, são oferecidos fitoterápicos com recursos da União em Estados e Municípios do Brasil, por exemplo, a espinheira santa, para o tratamento de gastrite e úlcera e o guaco para tosse e gripe (Portal da Saúde, 2010).

Entretanto, conforme Lapa et al. (2001), houve um aumento no uso de fitoterápicos em todo o mundo, refletido em um crescimento nas vendas, atingindo a marca de 7 milhões de dólares na Europa, 4 bilhões na Ásia e 7 bilhões nos Estados Unidos. Esta movimentação financeira tem atraído a atenção de empresas multinacionais que possuem recursos para custear os estudos de qualidade, eficácia e segurança no uso destes produtos. Realmente, o contraponto fica por conta da escassez de trabalhos que investiguem a eficiência, o potencial terapêutico, e a segurança no uso de fitoterápicos. Para Calixto (2005), poucas plantas com efeitos terapêuticos têm sido cientificamente estudadas, a fim de tornar o seu uso um método terapêutico de utilização sistematizada. Os países da América Latina possuem grande parte da biodiversidade mundial, sendo que o Brasil possui 20–22% de todas as plantas e microrganismos existentes no mundo. Porém, estima-se que não mais que 25.000 espécies de plantas sejam objeto de algum tipo de investigação científica (Calixto, 2005).

Muitos estudos são necessários para investigar o potencial terapêutico de extratos de plantas e a relação entre os compostos e seus efeitos biológicos. É sabido que através do sinergismo entre os metabólitos secundários pode haver uma potencialização ou diminuição da ação ou de efeitos indesejados dos extratos brutos de plantas (Elvin-Lewis, 2001).

## **1.2 AS PLANTAS MEDICINAIS E O SISTEMA NERVOSO CENTRAL**

Pesquisas por moléculas com ação terapêutica sobre enfermidades no sistema nervoso central (SNC) iniciaram no século XIX. Produtos naturais constituem uma importante fonte de pesquisa visando descobrir novas substâncias com atividade farmacológica (Albuquerque & Hanazaki, 2006). Porém, apesar dos primeiros usos nesta área terem sido baseados em plantas, atualmente elas representam uma pequena porcentagem das investigações (Gomes et al., 2009).

As plantas com atividade psicoativa exercem importante efeito sobre a consciência, as emoções e a cognição e, devido a esses efeitos, têm sido utilizadas milenarmente com finalidade terapêutica (Subhan et al., 2008). Neste contexto alguns exemplos de plantas investigadas que apresentaram atividade neuroprotetora são mencionadas a saber, *Hedyotis diffusa* (Kim et al., 2001), *Ginkgo biloba* (Zhu et al., 1997), *Gastrodia elata* (Anderson et al., 1995), *Hiperycum perforatum* (Muller et al., 2000), *Scutellaria baicalensis*, *Stephania tetrandia* e *Salvia miltiorrhiza* (Sun et al., 2003), *Bacopa monnieri* (Paulose et al., 2008) e *Curcuma longa* (Kulkarni & Dhir, 2010). Algumas destas espécies também confirmaram seu efeito terapêutico em transtornos do SNC como ansiedade, depressão e/ou epilepsia. Entretanto, apesar da crescente pesquisa de plantas em modelos animais poucos dados clínicos estão disponíveis (Adams et al., 2007), com exceção dos extratos de *Ginkgo biloba* e *Hiperycum perforatum* e a galantamina, componente extraído de *Galanthus woronowii*.

Os extratos de plantas, em geral, representam uma fonte de substâncias com capacidade antioxidante, sendo esta atribuída principalmente aos polifenóis e carotenóides. Os efeitos destes metabólitos secundários têm sido associados à capacidade de diminuir o risco de certo número de doenças, em particular aquelas associadas a lesões oxidativas como, câncer, doenças cardiovasculares ou neurodegenerativas (Serafini et al., 2001). Segundo Gomes et al (2009), os estudos estão mais focados em alcalóides, aminoácidos, flavonóides, fenólicos e polifenóis, mas outras classes de compostos não deveriam ser excluídos das investigações pois também podem exercer um efeito antioxidante.

Um considerável número de extratos de plantas e seus constituintes, utilizados como agentes antidepressivos e para demência, possuem ações antioxidante e neuroprotetora, possuindo potencial terapêutico na doença de Alzheimer (DA), distúrbios de comportamento como a depressão e esquizofrenia (Lee et al., 2002). Também nos transtornos agudos, como isquemia ou traumatismo, uma ação antioxidante e neuroprotetora poderia ser benéfica, pois a excitotoxicidade é um elemento chave nos diversos transtornos neurodegenerativos tanto crônicos como agudos, representando um alvo importante de neuroproteção.

### 1.3 ALOYSIA GRATISSIMA (GILLIES & HOOK.) TRONCOSO

*Aloysia* é um gênero pertencente à família Verbenaceae, compreendendo em torno de 30 espécies distribuídas pelas Américas, principalmente em países da América do Sul e Central (Burkart, 1979). *Aloysia gratissima* é uma planta nativa da América do Sul e muito utilizada no Brasil, Uruguai, Paraguai e Argentina. É conhecida no Brasil por diversos nomes populares, como “erva de nossa senhora”, “erva da graça”, “mimo do Brasil”, “garupá”, “erva da pontada”, “erva das sepulturas” e “erva santa” (Castro & Chemale, 1995). Na Argentina, de acordo com Ricciardi et al. (1999), é conhecida como “Angel”, “oreganillo”, “azahar del campo” e “niño rupá” (nome também utilizado pelos índios guaranis). No Uruguai, denomina-se “cedron del monte” e nos Estados Unidos “whitebrush”. *A. gratissima* foi classificada anteriormente por outros nomes botânicos, como: *Verbena gratissima* Gill et Hook; *Aloysia lycioides* Cham e *Lippia lycioides* (Cham) Steudel. (Castro & Chemale, 1995).

Segundo Castro & Chemale (1995), *A. gratissima* é uma planta perene, arbustiva, com altura de 1,5 a 3,0 metros, caule ereto, longo e fino, de casca áspera, acinzentada ou verde oliva. As folhas são simples, opostas, elíptico-lanceoladas, bordos lisos até a metade do limbo e serrilhadas da metade até o ápice, verde escura na face ventral e grisáceas na dorsal. As flores são pequenas, hermafroditas, muito perfumadas e o florescimento ocorre de agosto a fevereiro quando apresenta pequenas flores brancas (Figura 1).



**Figura 1.** *Aloysia gratissima*. Exemplar de *Aloysia gratissima* (esquerda) e detalhe inflorescências (direita) (A.L.B. Zeni, 2006).

No Rio Grande do Sul, de acordo com Soares et al. (2004), Vendruscolo et al (2005) e Souza & Wiest (2007), *A. gratissima* é utilizada principalmente para dores de cabeça, “problemas de nervos, distúrbios dos sistemas digestivo e respiratório, como gripes e bronquites”. Em Santa Catarina, seu uso foi observado no entorno do Parque Nacional da Serra do Itajaí (PNSI) em pelo menos duas localidades: Nova Rússia, em Blumenau (Zeni & Bosio, 2011) e Sterntal/Nova Sibéria, em Guabiruba (Zeni et al., submetido à revista *Hollos Environmental*) como sedativo e para tristeza, respectivamente. Na Argentina, também é utilizada para “problemas de nervos” como “levantar el ánimo” e como digestiva (Del Vitto et al., 1997; Arias Toledo, 2009; Dadé et al., 2009).

O óleo essencial de *A. gratissima* tem sido estudado quanto às atividades antiviral (García et al., 2003), anti-nematódea (Duschatzky et al., 2004) e antifúngica (Dellacasa et al., 2003). Quanto à constituição química Ricciardi et al. (2006) relataram componentes como  $\beta$ -elemeno, viridiflorol e  $\beta$ -cariofileno.

O extrato metanólico de *A. gratissima* tem atividade antioxidante (Rosas-Romero & Saavedra, 2005) e, conforme Vandresen et al. (2010), também possui efeitos, antibacteriano e anti-edematogênico. Entretanto, não existem publicações científicas sobre os efeitos de *A. gratissima* no SNC. Em relação a outras espécies deste gênero, os extratos de *A. polystachya* e *A. virgata* mostraram efeito ansiolítico (Mora et al., 2005; Wasowski & Marder, 2010), enquanto *A. polystachya* apresentou efeito antidepressivo (Hellión-Ibarrola, et al., 2008).

Não existem estudos de toxicidade publicados e são escassos os estudos fitoquímicos de *A. gratissima*. Neste sentido, Silva et al. (2006) relatam a presença de cauranos, flavonóides e feniletanóides, mas não iridóides, sendo esta composição química compatível com a família Lamiaceae. Além disso, Vandresen et al. (2010) também mostram a presença de sesquiterpenos ( $\alpha$ -bisabolol), triterpenos ( $\alpha$ -amirina, ácido betulínico, ácido oleanóico e, ácido ursólico) e, flavonóides (genkwanina, 5-hidróxi-7,4'-dimetoxiapigenina, 5-hidróxi-7,3',4'-trimetóxiluteolina e rutina).

A análise fitoquímica desenvolvida nesta tese (Capítulo 1) identificou a presença do ácido ferúlico como o composto majoritário do EA. O ácido ferúlico (AF; ácido 4-hidróxi-3-metoxicinâmico) é um composto fenólico presente em muitas plantas, extratos de plantas medicinais, condimentos e café (Graf, 1992; Virgili et al., 2000). O AF foi aprovado como aditivo antioxidante e conservante em alimentos no Japão (JFCRF, 1996). Além da atividade antioxidante e anti-inflamatória, Yu e colaboradores (2006), sugerem que o AF seria um antagonista competitivo do receptor de glutamato ionotrópico N-metil-D-aspartato (NMDA), com propriedades neuroprotetoras frente ao glutamato monossódico.

## 1.4 TRANSMISSÃO E EXCITOTOXICIDADE GLUTAMATÉRGICA

As principais vias excitatórias do SNC utilizam o aminoácido glutamato, um neurotransmissor envolvido em processos fisiológicos como cognição, aprendizado, memória e formação de redes neurais durante o desenvolvimento (Izquierdo & Medina, 1997), na adaptação ao ambiente (Danbolt, 2001) e no envelhecimento (Segovia et al., 2001).

Quando a concentração fisiológica extracelular de glutamato é aumentada este se torna tóxico, um quadro associado às doenças crônicas como a esclerose amiotrófica lateral, o Mal de Parkinson, DA e a depressão (Chen & Lipton, 2006, Mauri et al. 1998), bem como as doenças agudas do SNC, como a isquemia e o traumatismo craniano (Barnes & Slevin, 2003). Já foi provado que a excitotoxicidade glutamatérgica é derivada do aumento da concentração de glutamato durante a transmissão sináptica que, conseqüentemente, induz morte neuronal pela superestimulação de receptores ionotrópicos, NMDA, alfa-amino-3-hidróximetilisoxazol-propionato (AMPA)/cainato e também metabotrópicos (During & Spencer, 1993). A morte celular induzida por excitotoxicidade pode acontecer por apoptose, um fenômeno regulado, e também por necrose que, historicamente, foi considerada como sendo uma forma de morte celular não regulada. Entretanto, alguns estudos sugerem que a necrose também pode estar sujeita à regulação, sendo potencialmente susceptível à intervenção terapêutica. Sabe-se que o direcionamento da célula para uma dessas formas de morte é influenciado pelo seu estado energético (reserva de ATP). Como processo ativo, a apoptose requer reservas de ATP (pelo menos nas fases iniciais), ao passo que a necrose se instala quando há depleção total do ATP (Kerr et al., 1972). Também a morte por autofagia tem sido estudada e foi observado, em modelos *in vitro* ou *in vivo*, que a inibição deste evento durante a isquemia pode reduzir a apoptose (Uchiyama, 2001). Neste sentido, considera-se a indução à morte celular como alvo de estratégias de neuroproteção devido a sua participação na fisiopatologia das doenças neurodegenerativas, sejam elas agudas ou crônicas.

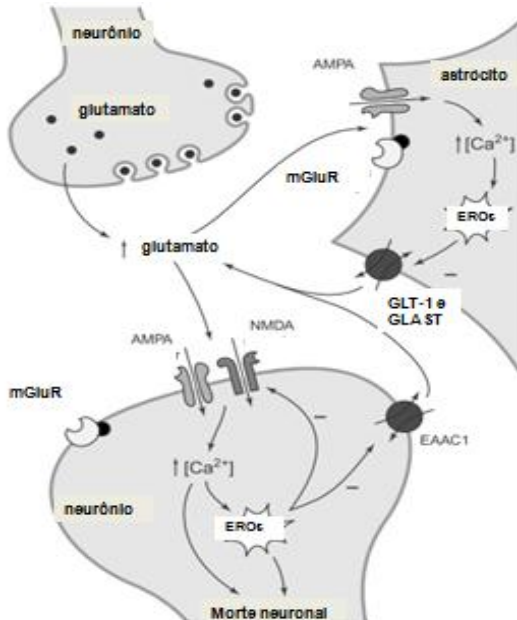
A manutenção da concentração fisiológica extracelular do neurotransmissor glutamato acontece através de transportadores específicos dependentes de  $\text{Na}^+$ , em humanos designados como transportadores de aminoácidos excitatórios (EAAT), sendo esta uma

função essencial das células gliais (Anderson & Swanson, 2000). Os mecanismos envolvidos na geração de excitotoxicidade e morte celular estão relacionados tanto com o aumento da liberação de glutamato, quanto à diminuição da captação de glutamato (Rossi et al., 2000).

Em situações de desequilíbrio iônico e diminuição nos níveis de ATP intracelular, verifica-se um acúmulo de  $\text{Na}^+$  no interior das células que pode ocasionar a atividade reversa dos transportadores glutamatérgicos (Rossi et al., 2000). Neste processo, o glutamato ao invés de ser captado é liberado para o meio, aumentando a sua concentração na fenda sináptica e, conseqüentemente, aumentando o dano celular (Camacho & Massieu, 2006).

De uma forma geral, os efeitos celulares induzidos pelo desequilíbrio na atividade dos EAATs exacerbam os danos induzidos por excitotoxicidade provocados, por exemplo, por uma isquemia cerebral. De fato, os dois processos são interdependentes, mas como a atividade dos EAATs é muito sensível à inibição por espécies reativas do oxigênio (EROs), acontece um aumento extracelular ainda maior dos níveis de glutamato (Trotti et al, 1998, Figura 2). Realmente, estudos recentes têm demonstrado que o aumento da atividade de transportadores de glutamato gliais (GLT-1) promove efeito protetor e também está associado com efeitos antidepressivos, em modelos animais e humanos (Valentine & Sanacora, 2009).



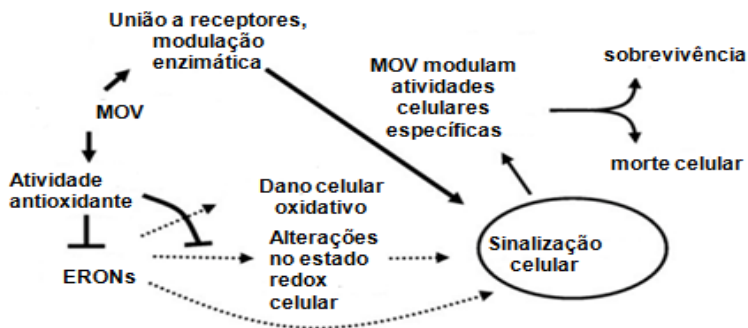


**Figura 2. Excitotoxicidade glutamatérgica.** Interações entre o glutamato e as espécies reativas de oxigênio (EROs) amplificam o efeito excitotóxico (Adaptado de Trotti et al., 1998).

Em condições fisiológicas, há um equilíbrio redox entre a produção e a inativação de espécies reativas por sistemas antioxidantes celulares, tais como o  $\alpha$ -tocoferol, ácido ascórbico, glutathiona reduzida (GSH) e o sistema das coenzimas nicotinamida adenina difosfato reduzida (NADPH). Estes agentes redutores podem regular as concentrações de peróxido de hidrogênio, hidroperóxidos lipídicos e não-lipídicos (Michiels et al., 1994). A produção excessiva de radicais livres e o consequente ataque destes aos ácidos graxos poli-insaturados, que organizam a membrana neural tem sido demonstrada (Halliwell & Gutteridge, 1999). Sendo assim, a ativação do receptor NMDA que resulta em aumento dos níveis de  $\text{Ca}^{2+}$ , formação de radicais livres, peroxidação lipídica e morte neuronal, pode ser atenuada por substâncias antioxidantes (Bruce et al., 1992, Mattson, 2008).

Também, sob condições fisiológicas, o glutamato ativa seus receptores sinápticos NMDA e AMPA desencadeando efetores tróficos, incluindo, fator responsivo ao elemento AMPc (CREB) e fator

neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), preservando a viabilidade neuronal, possivelmente pelo aumento da atividade antioxidante entre os neurônios. Em contraste, sob condições de excesso de glutamato, os receptores NMDA são ativados reduzindo atividade dos efetores tróficos causando atrofia e morte celular (Hardingham, 2006). Portanto, substâncias que diminuam a excitotoxicidade, a exemplo do antagonista do receptor NMDA, MK-801, podem ser ferramentas viáveis para auxiliar no tratamento de doenças neurodegenerativas relacionadas à excitotoxicidade glutamatérgica. Nesse sentido, substâncias derivadas de plantas, principalmente polifenóis e isoprenóides, têm tido seus mecanismos de ação analisados, além da atividade antioxidante, como a ativação de receptores e a modulação de enzimas (Figura 3).



**Figura 3. Moléculas de origem vegetal (MOV), efeito antioxidante ou sinalizador?** As MOV podem interagir com outras moléculas envolvidas em processos de sinalização celular e interferir neste processo, independente de suas propriedades antioxidantes, afetando a atividade de diversos alvos celulares (Adaptado de Virgili & Marino, et al., 2008).

## 1.5 DOENÇAS NEURODEGENERATIVAS

### 1.5.1 A Depressão

A depressão é um tipo de transtorno mental crônico e recorrente, caracterizado por sintomas como alterações no humor, irritação, baixa capacidade de concentração, diminuição ou aumento de

apetite, distúrbios do sono, cansaço e anedonia, que se caracteriza por uma diminuição de interesse por estímulos prazerosos (Richardson, 1991). A depressão afeta 20% da população e é uma das principais causas de afastamento do trabalho e de suicídios (Berton & Nestler, 2006).

O sistema mais estudado tem sido o serotoninérgico, amplamente reconhecido pelo envolvimento na etiologia da depressão e no mecanismo de substâncias com ação antidepressiva. Entretanto, tem crescido o número de pesquisas demonstrando também alterações na transmissão noradrenérgica (Wong & Licinio, 2001), o que mostra a participação dos adrenoceptores  $\alpha$ - e  $\beta$ - na ação de fármacos antidepressivos. Além disto, alguns estudos têm postulado que a função dopaminérgica reduzida estaria envolvida na patofisiopatologia da depressão, tendo sido observado um aumento dos transportadores dopaminérgicos em pacientes com depressão maior (Laasonen-Balk et al., 1999), podendo ser o fator determinante de uma menor disponibilidade de dopamina na fenda sináptica.

As bases biológicas da depressão e o preciso mecanismo da eficácia de antidepressivos não estão totalmente esclarecidos. Contudo, há pesquisas mostrando os sistemas glutamatérgico, noradrenérgico e serotoninérgico interagindo no mecanismo de ação de antidepressivos (Szasz et al., 2007), além do sistema dopaminérgico, sugerindo um mecanismo de ação interligando vários sistemas de neurotransmissão.

A depressão é atualmente considerada como uma doença neuropsiquiátrica e neurodegenerativa, devido às evidências de uma diminuição do volume hipocampal em pacientes com depressão (Sheline et al., 2003). Desta forma, sugere-se que fármacos com efeito neuroprotetor possam apresentar um efeito antidepressivo e vice-versa (An et al., 2008). Além disso, estudos demonstraram que antidepressivos clinicamente utilizados, bem como compostos com atividade antidepressiva, também exibiram propriedades neuroprotetoras relacionadas à neuroplasticidade e viabilidade celular (Kolla et al., 2005; Peng et al., 2008). Estes fatos apontam para o estudo de compostos com propriedades neuroprotetoras como potenciais agentes antidepressivos.

## 1.5.2 A Epilepsia

A epilepsia é uma das doenças mais comuns do SNC e se caracteriza por convulsões recorrentes induzidas pela ativação neuronal de forma excessiva no cérebro. Esta doença afeta milhões de pessoas no mundo em múltiplos níveis. Do ponto de vista econômico, o total dos custos da epilepsia gira em torno de US\$4 bilhões em despesas médicas diretas, combinadas com despesas indiretas como ausência ao trabalho, custo com cuidados em casa e morte precoce (Murray et al., 1996).

O ácido quinolínico (AQ, ácido 2,3-piridina dicarboxílico), um derivado endógeno do metabolismo do triptofano, se acumula no cérebro, sendo agonista do receptor NMDA causa excitotoxicidade através da elevação das concentrações de  $Ca^{2+}$ , diminuição de ATP e formação de radicais livres (Stone et al., 2002). A toxicidade do AQ tem sido implicada em diversas patologias do SNC e a sua administração intracerebroventricular (i.c.v.) em roedores induz à convulsões (Schmidt et al., 2000). O AQ induz à morte neuronal (Ganzella et al., 2006) com um padrão necrótico observado em fatias hipocâmpais (Piermartiri et al. 2009) e pode estar envolvido na etiologia de epilepsia em humanos (Heyes et al., 1990).

O AQ também pode superestimular o sistema glutamatérgico pela modulação do transporte de glutamato, diminuindo a captação pelos astrócitos e aumentando a liberação sinaptossomal de glutamato (Tavares et al. 2000; 2002).

A busca por novas drogas que promovam a neuroproteção é válida para o tratamento da epilepsia, pois, mesmo com o aumento de novas drogas anticonvulsivantes, o tratamento convencional desta doença ainda está associado com efeitos colaterais, toxicidade, bem como efeitos teratogênicos e, além disso, aproximadamente 30% dos pacientes continuam sofrendo crises convulsivas (Smith & Bleck, 1991).

Neste sentido, substâncias neuroprotetoras são bem vindas, tanto na prevenção como no tratamento das afecções associadas às doenças neurodegenerativas que, por possuírem etiologias ainda não totalmente conhecidas e um amplo espectro de sintomas, têm-se dificuldades maiores para encontrar medicamentos efetivos, com menos efeitos colaterais e baixo custo.

O estudo dos mecanismos dos efeitos das plantas medicinais em modelos animais tem se caracterizado por interferir com a patofisiologia de doenças através de múltiplos alvos, sendo eficazes tanto na prevenção como no tratamento de transtornos do SNC. Estes efeitos benéficos são observados no uso de extratos, como o chá-verde (Reznichenko et al., 2005) ou substâncias isoladas, como o polifenol curcumina (*Curcuma longa*), que tem ação neuroprotetora na DA, discinesia tardia, depressão maior e epilepsia principalmente em modelos animais (Kulkarni & Dhir, 2010).

## **1.6 VIAS DE SINALIZAÇÃO E A SOBREVIVÊNCIA CELULAR**

Muitas doenças do SNC são acompanhadas por inflamação (Brown & Bal-Price, 2003, Block et al., 2007) e estudos demonstram que há uma correlação entre a ativação de receptores de glutamato e o desenvolvimento de processo inflamatório no SNC (Matute, 2007). Estudos *in vitro* e *in vivo* sugerem o envolvimento da estimulação de receptores de glutamato na indução da expressão da enzima óxido nítrico sintase (iNOS, Cárdenas et al., 2000; Moro et al., 2004).

Existem três isoformas de enzima óxido nítrico sintase (NOS), neuronal, tipo I, endotelial (tipo III) que são constitutivamente expressas e dependentes de cálcio, e a NOS induzível (tipo II), que é expressa após mudanças imunológicas e danos neuronais, sendo normalmente independente de cálcio (Samdani et al., 1997). A NOS catalisa a conversão de L-arginina em óxido nítrico (NO) e citrulina na presença de oxigênio, NADPH,  $Fe^{+}$  e  $BH_4$ . NO em concentrações fisiológicas participa da sinalização celular, resultando, por exemplo, em proliferação celular, mas em altas concentrações, principalmente por causa da iNOS, o NO é uma molécula de defesa contra patógenos (Floyd, 1999, Murphy, 2000). Por outro lado, a indução de iNOS resulta em morte neuronal tardia *in vitro* (Dawson et al., 1994) e também pode agravar a excitotoxicidade glutamatérgica (Hewett et a., 1994), implicando o aumento de expressão de iNOS na neurodegeneração. Portanto, o estudo da modulação da produção de NO pode oferecer alvos clínicos importantes.

Uma via muito estudada envolvida em crescimento celular, sobrevivência e metabolismo é a via proteína cinase 3-fosfatidilinositol/proteína cinase B (PI3K/Akt). A ativação da via de sinalização intracelular PI3K leva à formação de segundos mensageiros como o fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP<sub>3</sub>) e fosfatidilinositol-3,4-bisfosfato (PIP<sub>2</sub>). Esses segundo-mensageiros se ligam a um domínio amino-terminal presente na proteína Akt, permitindo que esta seja ativada através da fosforilação de seus sítios Treonina-308 e Serina-473.

A Akt pode inibir apoptose, agindo através da modulação de vários fatores que influenciam a morte celular, como membros da família de proteínas anti e pró-apoptóticas, e bloqueia a liberação do citocromo c, inibindo a ativação de caspase-3, regulando a apoptose (Brunet et al., 2001; Nakae et al., 2000). Neste sentido, foi demonstrado que após toxicidade induzida por isquemia ocorre uma drástica diminuição no conteúdo de Akt fosforilada e este evento precede a liberação de citocromo c e ativação de caspases (Amantea et al., 2009).

Em culturas de neurônios corticais expostas a concentrações excitotóxicas de glutamato ocorre a diminuição da fosforilação da Akt, causando um aumento da ativação de caspase-3 e morte celular (Nishimoto et al., 2008). Segundo Guillet et al. (2005), a via de sinalização PI3K é crítica à captação de glutamato, interferindo no deslocamento e expressão de transportadores de glutamato na membrana celular. Desta forma, esta via pode estar envolvida na prevenção de eventos que desencadeiam a morte celular de uma forma precoce e mais ampla.

## 1.7 JUSTIFICATIVA

O benefício terapêutico do extrato aquoso de *Aloysia gratissima* (EA) no tratamento de doenças que afetam o SNC, apesar de não ter sido previamente demonstrado de forma científica, tem sido observado pelos moradores de comunidades rurais adjacentes ao PNSI (Parque Nacional da Serra do Itajaí) que utilizam a decocção para amenizar os sintomas de transtornos do SNC.

Considerando a importância dos danos causados pelo processo excitotóxico, fator presente nos transtornos neurológicos/neurodegenerativos e a falta de agentes neuroprotetores

eficazes, tornam-se necessárias novas terapias e/ou fármacos com envolvimento na modulação da transmissão glutamatérgica.

Nesse sentido, este estudo foi delineado a fim de avaliar a composição química, toxicidade e os efeitos antioxidante, neuroprotetor, tipo antidepressivo e anticonvulsivante do EA, bem como os possíveis mecanismos de ação envolvidos nestes efeitos. Também foi investigado o composto majoritário do EA, o ácido ferúlico a fim de verificar se este pode ser responsável pelos efeitos biológicos observados no EA. Desta forma, estes resultados serão parte das informações científicas na investigação do conhecimento etnofarmacológico de *Aloysia gratissima*, planta medicinal utilizada em transtornos do SNC.

## **1.8. OBJETIVOS**

### **1.8.1. Objetivo Geral**

Investigar a composição química, toxicidade e efeitos neuroprotetor e tipo antidepressivo do extrato aquoso de *Aloysia gratissima* (EA), bem como avaliar os possíveis mecanismos de ação envolvidos nestes efeitos.

### **1.8.2. Objetivos Específicos**

- Selecionar o extrato aquoso com maior teor de polifenóis e carotenóides, através da determinação do perfil metabólico sazonal de EA;
- Investigar os possíveis efeitos tóxicos de EA quando administrado por via oral e de forma aguda em camundongos, sob parâmetros comportamentais, bioquímicos, hematológicos e morfológicos;
- Avaliar o efeito neuroprotetor do EA frente à excitotoxicidade, induzida por glutamato, em fatias de hipocampo de ratos e camundongos, bem como o envolvimento da via PI3K/Akt e a enzima iNOS neste efeito;
- Avaliar o possível efeito anti-convulsivante do EA previamente administrado em camundongos infundidos intracerebroventricularmente com ácido quinolínico e verificar o efeito neuroprotetor nas fatias de hipocampo obtidas destes animais;

- Avaliar atividade tipo antidepressiva do EA administrado via oral, nos testes de nado forçado e suspensão da cauda em camundongos e os mecanismos de ação envolvidos nesta atividade;
- Investigar o envolvimento de sistemas de neurotransmissores e vias de sinalização no efeito tipo antidepressivo do ácido ferúlico, um dos compostos majoritários do EA.



**CAPÍTULO 1**  
*POLYPHENOLIC AND CAROTENOIDIC SEASONAL PROFILE AND  
BIOACTIVITY OF THE ALOYSIA GRATISSIMA (VERBENACEAE)*

Manuscrito submetido à revista Phytotherapy Research

## **CAPÍTULO 2**

### ***ACUTE TOXICOLOGICAL EVALUATION OF THE TRADITIONAL MEDICINE ALOYSIA GRATISSIMA (GILL ET HOOK) TRONC. IN MICE***

Manuscrito submetido à revista Journal of Medicinal Foods

### **CAPÍTULO 3**

#### ***NEUROPROTECTIVE EFFECTS OF ALOYSIA GRATISSIMA AQUEOUS EXTRACT AGAINST GLUTAMATE EXCITOTOXICITY IN RAT HIPPOCAMPAL SLICES***

Manuscrito a ser submetido à revista Neurochemical Research

## **CAPÍTULO 4**

### ***ALOYSIA GRATISSIMA PREVENTS CELLULAR DAMAGE INDUCED BY QUINOLINIC ACID IN MICE HIPPOCAMPUS BY MODULATION OF GLUTAMATE TRANSPORT***

Manuscrito submetido à revista Phytomedicine

## **CAPÍTULO 5**

### ***ANTIDEPRESSANT-LIKE AND NEUROPROTECTIVE EFFECTS OF ALOYSIA GRATISSIMA: INVESTIGATION OF INVOLVEMENT OF L- ARGININE-NITRIC OXIDE-CYCLIC GUANOSINE MONOPHOSPHATE PATHWAY***

Manuscrito submetido à revista Journal of Ethnopharmacology



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Ethnopharmacology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jethpharm



## Antidepressant-like and neuroprotective effects of *Aloysia gratissima*: Investigation of involvement of L-arginine-nitric oxide-cyclic guanosine monophosphate pathway

Ana Lúcia Bertarello Zeni<sup>a,b</sup>, Andréa Dias Elpo Zomkowski<sup>a</sup>, Tharine Dal-Cim<sup>a</sup>, Marcelo Maraschin<sup>c</sup>, Ana Lúcia S. Rodrigues<sup>a</sup>, Carla I. Tasca<sup>a,1</sup>

<sup>a</sup> Biochemistry Department, Biological Sciences Center, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis 88040-900, SC, Brazil

<sup>b</sup> Natural Sciences Department, Natural and Exact Sciences Center, Regional University of Blumenau, Blumenau 89012-900, SC, Brazil

<sup>c</sup> Plant Morphogenesis and Biochemistry Laboratory, Plant Science Center Federal University of Santa Catarina, Florianópolis 88040-900, SC, Brazil

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 14 March 2011

Received in revised form 10 June 2011

Accepted 3 July 2011

Available online xxx

#### Keywords:

Depression

*Aloysia gratissima*

Tail suspension test

Glutamate

Excitotoxicity

NMDA

### ABSTRACT

**Ethnopharmacological relevance:** *Aloysia gratissima* (Gill. et Hook) Tronc. (Verbenaceae) is used traditionally for the treatment of headache, bronchitis, and nervous systems disorders including depression.

**Aim of the study:** To investigate the antidepressant-like and neuroprotective effects of *Aloysia gratissima* aqueous extract (AE) and the involvement of L-arginine-nitric oxide (NO)-cyclic guanosine monophosphate (cGMP) pathway.

**Materials and methods:** The antidepressant-like effect of AE was evaluated through behavioral despair in forced swimming test (FST) and tail suspension test (TST). Swiss albino mice were treated by oral route and after 1 h were analyzed the time of immobility in the FST and TST. In addition, the neuroprotective effect of AE against glutamate excitotoxicity was evaluated through cell viability of hippocampal slices, phosphorylation of Akt, and the immuncontent of inducible oxidase nitric synthase (iNOS) were investigated by western blotting.

**Results:** The immobility time in the FST and TST were reduced by AE (100–1000 and 10–300 mg/kg, respectively). The antidepressant-like effect of AE in the TST was prevented by the pretreatment with N-methyl-D-aspartate (NMDA), L-arginine or sildenafil. The subjective dose of AE produced a synergistic antidepressant-like effect with MK-801 (an antagonist of NMDA receptor), methylene blue, L-NNA (an inhibitor of NO synthase) or ODQ (an inhibitor of soluble guanylate cyclase). In *ex vivo* experiments, pretreatment with AE prevented the loss of cell viability induced by glutamate, thus affording neuroprotection. Glutamate toxicity caused a decreased Akt phosphorylation and an increased iNOS expression.

**Conclusions:** The present study provides convincing evidence of neuroprotection and the involvement of the L-arginine-NO-cGMP pathway in the antidepressant-like effect of AE. Therefore, AE could be of potential interest for the treatment of depressive disorders and neurological conditions associated with glutamate excitotoxicity.

© 2011 Published by Elsevier Ireland Ltd.

### 1. Introduction

*Aloysia gratissima* (Gill. et Hook) Tronc. is an aromatic native plant belonging to Verbenaceae family which is widely distributed

in subtropical regions of South America, mainly Brazil, Uruguay, Paraguay, and Argentina. In Brazil it is popularly named “erva santa”, “erva de nossa senhora” and “garupá”, among others. The aerial parts of this plant species are used for the treatment of headache, bronchitis and nervous systems disorders (Souza and Wiest, 2007), digestive and depression (Vendruscolo et al., 2005; Arias Toledo, 2009).

In other species of *Aloysia*, i.e., *Aloysia polystachya*, the hydro-ethanolic extract of aerial parts has been shown to exhibit anxiolytic (Hellióñ-Ibarrola et al., 2006) and antidepressant-like effects in mice (Hellióñ-Ibarrola et al., 2008) and in rats (Mora et al., 2005). Two active diterpenes were isolated from the aerial parts of *Aloysia virgata* exhibiting anxiolytic-like effect in mice (Wasowski and Marder, in press). However, to the best of our knowledge,

**Abbreviations:** AE, *Aloysia gratissima* aqueous extract; cGMP, cyclic guanosine monophosphate; FST, forced swimming test; MK-801, (+)-5-methyl-10,11-dihydro-5H-dibenzo[*a,d*]cyclohepten-5,10-imine maleate; MTT, (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-diphenyltetrazolium bromide; NMDA, N-methyl-D-aspartate; L-NNA, N<sup>o</sup>-nitro-L-arginine; NO, nitric oxide; NOS, nitric oxide synthase; ODQ, 1H-[1,2,4]oxadiazole[4,3-*a*]quinoxalin-1-one; PDES, phosphodiesterase-5; TST, tail suspension test.

<sup>1</sup> Corresponding author. Tel.: +55 48 3721 5046; fax: +55 48 3721 9672.

E-mail address: tasca@ccb.ufsc.br (C.I. Tasca).

0378-8741/\$ – see front matter © 2011 Published by Elsevier Ireland Ltd.  
doi:10.1016/j.jep.2011.07.009

129

Please cite this article in press as: Zeni, A.L.B., et al., Antidepressant-like and neuroprotective effects of *Aloysia gratissima*: Investigation of involvement of L-arginine-nitric oxide-cyclic guanosine monophosphate pathway. *J. Ethnopharmacol.* (2011), doi:10.1016/j.jep.2011.07.009

there is no scientific report related to antidepressant-like effects of *Aloysia gratissima*.

The essential oil of leaves of *Aloysia gratissima* has been reported to exhibit virucidal (Garfía et al., 2003), nematocidal (Duschatzky et al., 2004), and fungicidal (Dellacasa et al., 2003) activities. The ethanolic extract of aerial parts of *Aloysia gratissima* presents chemical compounds such as kaurenes, flavonoids and phenylethanoids (Silva et al., 2006), and sesquiterpens ( $\alpha$ -bisabolol), triterpens ( $\alpha$ -amirin, betulinic acid, oleoanic acid, and ursolic acid), and flavonoids (genkwanin, 5-hydroxy-7,4-dimethoxyapigenin, 5-hydroxy-7,3',4'-trimethoxyfluteolin and rutin) were found in the methanolic extract of leaves (Vandresen et al., 2010). The methanolic extract showed antibacterial and anti-edematogenic properties (Vandresen et al., 2010) and also antioxidant effect as documented by Rosas-Romero and Saavedra (2005).

Depressive disorders have high incidence in the world population (Berton and Nestler, 2006), with impact in the social function and in the life quality of patients (Nemeroff, 2007). The treatment of depression with conventional antidepressants (monoamine oxidase inhibitors, tricyclics, selective serotonin reuptake inhibitors, selective noradrenaline reuptake inhibitors) provides a complete remission just for 50% of the individuals (Rush et al., 2003) and antidepressant therapy produces side effects (Brunello et al., 2002) that may reduce the adhesion of patients to treatment (MacGillivray et al., 2003). Therefore, additional treatment strategies with favorable side effects profile, credible benefits, and moderate costs are of particular interest (Laakmann et al., 1998).

In the search of new molecules useful for the treatment of neurological disorders, medicinal plant research worldwide has progressed constantly, demonstrating the pharmacological effectiveness of different plant species in a variety of animal models (Zhang, 2004). Plant extracts – including St. John's wort – have been used for the treatment of some psychiatric disorders that is largely studied for the treatment of depression (Linde and Knuppel, 2005) and *Ginkgo biloba* (Sakakibara et al., 2006).

Although the monoaminergic system has been widely studied regarding the mechanism of action of antidepressants, the glutamatergic system has been proposed as an important target for the action of novel antidepressant agents (Skolnick, 1999; Sanacora et al., 2008). Noteworthy, targeting NMDA receptor blockade, particularly with the administration of the NMDA receptor antagonist ketamine produces improvement of the depressive symptoms much faster than conventional monoaminergic agents in patients resistant to conventional drug treatment strategies (Zarate et al., 2006; Maeng and Zarate, 2007; Sanacora et al., 2008). NMDA receptor stimulation induces the activation of nitric oxide synthase (NOS) that converts L-arginine to NO and L-citrulline (Espluggues, 2002). It has been also demonstrated that NOS inhibitors exert antidepressant-like effects in depression models (Dhir and Kulkarni, 2007; Ulak et al., 2008). Moreover, several studies suggest that the inhibition of NO synthesis, with a subsequent decrease in the concentration of cGMP, produce antidepressant-like effects (Kaster et al., 2005). Noteworthy, the NMDA receptors and the L-arginine-nitric oxide (NO)-cGMP pathway are promising molecular targets for the action of antidepressant drugs.

Therefore, this study was aimed, firstly, to examine the effects of the oral administration of AE in two predictive models of antidepressant activity, the forced swimming test (FST) and the tail suspension test (TST). Secondly experiments were performed to investigate a possible participation of the L-arginine-NO-cGMP pathway in the antidepressant-like effect of *Aloysia gratissima* in the TST. Furthermore, this study analyzed, by using an *ex vivo* approach, the ability of AE treatment to counteract hippocampal glutamate excitotoxicity and the involvement of Akt phosphorylation and iNOS expression in the neuroprotection afforded by AE.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Animals

Swiss male mice weighing 30–40 g were maintained at 21–23 °C with free access to water and food under a 12 h light/dark cycle (lights on at 7:00 h-am). All the manipulations were carried out between 9:00 and 16:00 h, with each animal used only once. These experiments were performed after approval of the protocol by the Ethics Committee of the Institution and all efforts were made to minimize animal suffering.

### 2.2. Plant material

#### 2.2.1. Botanic material

The aerial parts of *Aloysia gratissima* (Gill. et Hook) Tronc. were collected from the boundaries of Serra do Itajaí National Park, Guabiruba city, Santa Catarina state, Brazil in autumn, 2006. The plant material was identified and authenticated taxonomically at Regional University of Blumenau. A voucher specimen (#2658) of the collected was deposited in the Dr. Roberto Miguel Klein Herbarium for future reference.

#### 2.2.2. Preparation of extract

Aerial parts of *Aloysia gratissima* were washed, and then the dried material was powdered. The powdered material (2.5 g) was extracted with boiling water (150 ml) for 5 min. The aqueous extract of *Aloysia gratissima* (AE, yield 25.71%) was filtered, lyophilized, stored in freezer at –20 °C and resolubilized in distilled water at the time of administration.

### 2.3. Drugs and treatment

The following drugs were used: L-arginine, L-glutamate,  $N^G$ -nitro-L-arginine (L-NNA), methylene blue, MK-801, NMDA, [1H-[1,2,4]oxadiazole[4,3-a]quinoxalin-1-one] (ODQ) (Sigma Chemical Co, USA) and sildenafil citrate (Pfizer). All drugs were dissolved in saline, except ODQ which was dissolved in vehicle with 1% DMSO and 7-nitroindazole that was dissolved in vehicle with few drops of Tween-80. All drugs were administered by intraperitoneal (i.p.) route in a constant volume of 10 ml/kg body weight, except NMDA and ODQ which were administered by intracerebroventricular (i.c.v.) route. AE was also administered by oral (p.o.) route by gavage in a volume of 10 ml/kg body weight. Animals were restricted from food 1 h before and after the AE administration.

i.c.v. administration was performed using a microsyringe (25  $\mu$ l, Hamilton) connected to a 26-gauge stainless-steel needle that was inserted perpendicularly 2 mm deep through the skull according to the procedure originally described by Laursen and Belknap (1986). Briefly, the animals were anesthetized with ether and then gently restrained by hand for i.c.v. injections. The sterilization of the injection site was carried out using gauze embedded in 70% ethanol. Under light anesthesia (i.e. just that necessary for loss of the postural reflex), the needle was inserted unilaterally 1 mm to the midline point equidistant from each eye, at an equal distance between the eyes and the ears and perpendicular to the plane of the skull. A volume of 5  $\mu$ l of sterile saline containing the drugs was injected directly into the lateral ventricle, at the following coordinates from bregma taken from the atlas of Franklin and Paxinos (2001) anteroposterior (AP) = –0.1 mm; mediolateral (ML) = 1 mm; and dorsoventral (DV) = –3 mm. Mice exhibited normal behavior within 1 min after injection. After completion of the experiments, all animals were decapitated and their brains were examined freshly. Results from mice presenting misplacement of the cannula or any sign of cerebral hemorrhage were excluded from

the statistical analysis (overall less than 5% of the total animals used).

The AE was dissolved in distilled water and administered acutely by oral route (p.o.) 60 min before the FST (30–1000 mg/kg, p.o.), TST (3–1000 mg/kg, p.o.) or open-field test. The dissolution of the extract was freshly done from the lyophilized powder immediately before its administration by gavage. A control group received distilled water as vehicle. In the experiments designed to study the time-course effect of AE (10 mg/kg, p.o.), the immobility time in the TST and the number of crossings in the open-field test were assessed in an independent group of mice, 1 h, 2 h, 4 h, and 12 h after the administration of AE (10 mg/kg, p.o.).

To test the hypothesis that the antidepressant-like effect AE is mediated through the inhibition of NMDA receptors, mice were pretreated with NMDA (0.1 pmol/site, i.c.v.) and 15 min after, AE (10 mg/kg) or vehicle was administered. Sixty minutes later the TST was carried out. The dose of NMDA was chosen based on previous studies (Brocardo et al., 2008; Zomkowski et al., 2010).

In another set of experiments, we investigated the synergistic effect of a sub-effective dose of AE (3 mg/kg, p.o.) with a sub-effective dose of MK-801 (0.001 mg/kg, i.p., a non-competitive NMDA receptor antagonist), AE or vehicle was administered 30 min before MK-801. A further 30 min were allowed to elapse before the animals were tested in the TST.

To investigate whether the antidepressant-like effect of AE is mediated through the involvement of the L-arginine-NO pathway in the TST, mice were pretreated with L-arginine, a precursor of nitric oxide (750 mg/kg, i.p., a dose that produces no effect in the tail suspension test). Thirty minutes after L-arginine, AE (10 mg/kg) or vehicle was administered, and 60 min later the TST was carried out.

In another experiment, we also investigated the effect of AE (3 mg/kg, a sub-effective dose) with sub-effective doses of L-NNA (0.3 mg/kg, i.p., a competitive inhibitor of NO synthase with selectivity for the neuronal and endothelial isoforms of the enzyme), methylene blue (20 mg/kg, i.p., an inhibitor of both NO synthase and soluble guanylate cyclase) or ODQ (30 pmol/site i.c.v., a selective inhibitor of soluble guanylate cyclase), AE or vehicle was administered 30 min before the drugs and 30 min later the animals were tested in the TST.

To investigate the role of cyclic GMP (cGMP) in the antidepressant-like action of AE, mice received an injection of sildenafil (5 mg/kg, i.p., a phosphodiesterase 5 inhibitor), or vehicle, 30 min before AE (10 mg/kg), and a further 30 min elapsed before the animals were tested in the TST. The dose of sildenafil was chosen based on previous studies (Kaster et al., 2005; Almeida et al., 2006; Dhir and Kulkarni, 2007; Zomkowski et al., 2010).

#### 2.4. Forced swimming test (FST)

For the FST mice were individually forced to swim in an open cylindrical container (diameter 10 cm, height 25 cm), containing 19 cm of water at  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ ; the total duration of immobility during a 6 min test was scored as described previously by Kaster et al. (2005). Each mouse was judged to be immobile when it ceased struggling and remained floating motionless in the water, making only those movements necessary to keep its head above water.

#### 2.5. Tail suspension test (TST)

The tail suspension test has become one of the most widely used models for assessing antidepressant-like activity in mice. The test is based on the fact that animals subjected to the short-term, inescapable stress of being suspended by their tail, will develop an immobile posture. The total duration of immobility induced by tail suspension was measured according to the method described

by Steru et al. (1985). Briefly, mice both acoustically and visually isolated were suspended 50 cm above the floor by adhesive tape placed approximately 1 cm from the tip of the tail. Immobility time was recorded during a 6 min period (Rodrigues et al., 2002; Machado et al., 2007). Mice were considered immobile only when they hung passively and completely motionless. The immobility time was recorded by an observer blind to the drug treatment.

#### 2.6. Open-field test

The forced swimming test has some drawbacks represented by the possibility of obtaining false positives or negatives. Drugs enhancing locomotor activity can evoke a 'false' positive effect in these tests, whereas drugs decreasing locomotion may give a 'false' negative result (Borsini and Meli, 1988). Therefore, in order to rule out an interference of the locomotor activity in the interpretation of the results obtained in the immobility tests, the locomotor activity was measured in the open-field test as described previously (Zomkowski et al., 2010). The open field arena used was a wooden box (40 cm  $\times$  60 cm  $\times$  50 cm) with the floor divided into 12 equal squares. At the start of each trial a mouse was placed in the left corner of the field and was allowed to freely explore the arena. The number of squares crossed with all paws (crossing) was counted in a 6 min session. The arena floor was cleaned between the trials with a 10% ethanol solution and the test was carried out in a temperature, noise and light controlled room.

#### 2.7. Ex vivo neurochemical experiments

##### 2.7.1. Treatment of mice with AE and preparation of hippocampal slices

The AE (10, 30 and 100 mg/kg) was administered by gavage and after 1 h mice were killed by decapitation and the hippocampus was rapidly removed and placed in ice-cold Krebs–Ringer bicarbonate (KRB) buffer (122 mM NaCl, 3 mM KCl, 1.2 mM  $\text{MgSO}_4$ , 1.3 mM  $\text{CaCl}_2$ , 0.4 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 25 mM  $\text{NaHCO}_3$  and 10 mM D-glucose). The buffer was bubbled with 95%  $\text{O}_2$ –5%  $\text{CO}_2$  up to pH 7.4. Slices (0.4 mm thick) were rapidly prepared using a McIlwain Tissue Chopper, separated in KRB at  $4^\circ\text{C}$  and allowed to recover for 30 min in KRB at  $37^\circ\text{C}$  (Oliveira et al., 2002).

##### 2.7.2. Slices incubation

Hippocampal slices were incubated with glutamate (10 mM) (Sigma) for 1 h in KRB. After this period, the medium was withdrawn and replaced by a nutritive incubation medium composed of 50% of KRB, 50% of Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Gibco), 20 mM HEPES, and 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  gentamicin, at  $37^\circ\text{C}$  in a  $\text{CO}_2$  atmosphere for additional 6 h in order to evaluate cell viability (Moiz et al., 2008).

##### 2.7.3. Evaluation of cell viability

2.7.3.1. MTT reduction. Hippocampal cell viability was evaluated 6 h after glutamate exposure. Cell viability was determined through the ability of cells to reduce MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-diphenyltetrazolium bromide; Sigma) (Mosmann, 1983). Hippocampal slices were incubated with MTT (0.5 mg/ml) in KRB for 30 min at  $37^\circ\text{C}$ . The tetrazolium ring of MTT can be cleaved by active dehydrogenases in order to produce a precipitated formazan. The formazan produced was solubilized by adding DMSO, resulting in a colored compound whose optical density was measured in an ELISA reader (550 nm).

##### 2.7.4. Western blot analysis

Slices were solubilized with a SDS-sample solution (4% SDS, 2 mM EDTA, 8%  $\beta$ -mercaptoethanol, and 50 mM Tris, pH 6.8). Samples (60  $\mu\text{g}$  of total protein/track) were separated by SDS-PAGE

Please cite this article in press as: Zeni, A.L.B., et al., Antidepressant-like and neuroprotective effects of *Aloysia gratissima*: Investigation of involvement of L-arginine-nitric oxide-cyclic guanosine monophosphate pathway. J. Ethnopharmacol. (2011), doi:10.1016/j.jep.2011.07.009



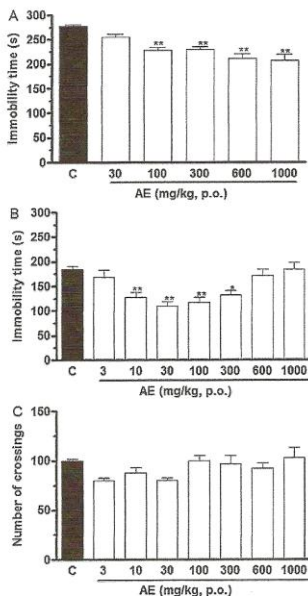


Fig. 1. Effect of *Aloystia gratissima* (AE) (3–1000 mg/kg, p.o.) in the FST (A), in the TST (B) and in the open-field test in mice (C). Values are expressed as mean  $\pm$  S.E.M. (n=6–11). \* $P$ <0.05; \*\* $P$ <0.01 as compared with the vehicle-treated control.

using a 10% gel. The amount of protein loading was controlled by Ponceau staining of the nitrocellulose membranes. Proteins separated by SDS-PAGE were transferred to nitrocellulose membranes using a 350 mA, 100V current (1 h, 4 °C) (Molz et al., 2008). The membranes were blocked with 5% slim-milk (1 h) in TBS (10 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7.5). All steps were followed by three times washing with TBS-T (0.05% Tween-20, 10 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7.5). Primary antibodies were selective for phospho-Akt and total-Akt (Sigma, 1:1000), iNOS (Santa Cruz Biotech, 1:10,000), and  $\beta$ -actin (Santa Cruz Biotech, 1:2000). Immunocomplexes were visualized using the ECL detection system as recommended by the manufacturer. The optical density of bands was quantified by using the Scion Image software (Scion Corporation).

### 2.7.5. Measurement of protein content

Protein content was evaluated by the method of Peterson (1977) in samples diluted in SDS solution. Bovine serum albumin (Sigma) was used as standard.

### 2.8. Statistical analysis

In the behavioral experiments, comparisons among treatment groups and control were performed by one-way or two-way ANOVA followed by Tukey's test, when appropriate. In the *ex vivo*

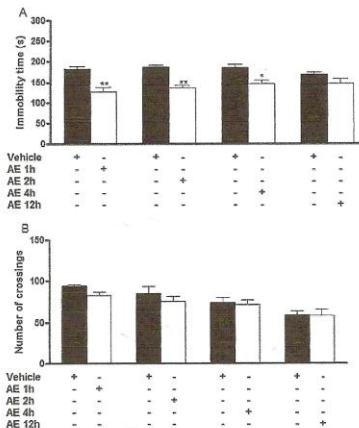


Fig. 2. Time-course effect of the oral administration of EA (10 mg/kg) in the immobility time in the TST (A) and on the number of crossings in the open-field test (B) behavior in mice. EA was administered 1, 2, 4 or 12 h before the test. Values are expressed as mean  $\pm$  S.E.M. (n=6–7). \*\* $P$ <0.01, \* $P$ <0.05 compared with the vehicle-treated control group.

experiments a one-way ANOVA was used followed by Duncan's test, when appropriate.

## 3. Results

### 3.1. Effect of acute treatment with AE on the immobility time in the FST, TST and locomotor activity in the open-field test

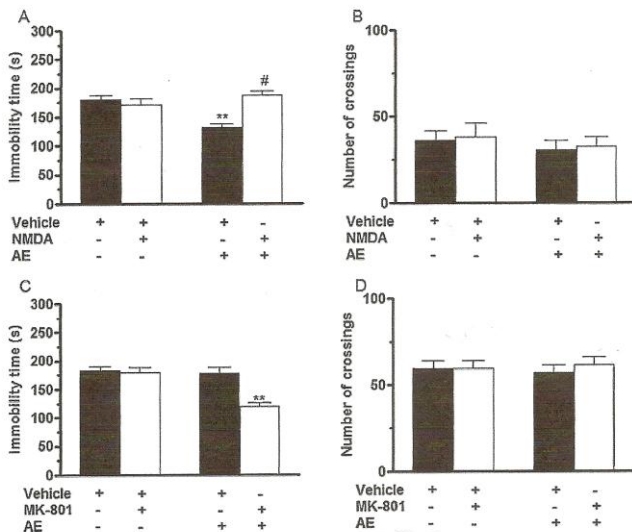
The effect of the acute administration of AE on the immobility time in the FST and TST is shown in Fig. 1A and B, respectively. The administration of 30 mg/kg of AE was ineffective to reduce the immobility time, as compared to control mice. The treatment of mice with AE (effective dose range: 100–1000 mg/kg) by p.o. route significantly decreased the immobility time in the FST ( $F$  5.39 = 17.38,  $P$  < 0.01).

AE also caused a reduction in the immobility time in the TST when administered by p.o. route (effective dose range: 10–300 mg/kg) ( $F$  7.47 = 8.34,  $P$  < 0.01). However, the administration of lower (3 mg/kg) and higher (600 or 1000 mg/kg) doses of AE was ineffective to reduce the immobility time, showing a bell-shaped curve effect for AE in the TST. AE did not produce any change in ambulation in an open-field test in all doses tested ( $F$  7.52 = 1.89,  $P$  = 0.09) in a separate experiment as compared to the control group (Fig. 1C).

### 3.2. Time-course effect of AE on the immobility time in the TST and locomotor activity in the open-field test

The time-course effect of the oral administration of AE on the immobility time in the TST is shown in Fig. 2A. The treatment of mice with AE (10 mg/kg, p.o.) produced a marked effect in the TST as early as 1 h after its administration, an action that remained statistically significant until 4 h after its administration. Two-way ANOVA

Please cite this article in press as: Zeni, A.L.B., et al., Antidepressant-like and neuroprotective effects of *Aloystia gratissima*: Investigation of involvement of L-arginine-nitric oxide-cyclic guanosine monophosphate pathway, *J. Ethnopharmacol.* (2011), doi:10.1016/j.jep.2011.07.009



**Fig. 3.** Effect of the pretreatment of mice with NMDA (0.1 pmol/site, i.c.v.) on the anti-immobility action of AE (10 mg/kg, p.o.) or treatment of MK-801 (0.001 mg/kg, i.p.) in combination with a sub-effective dose of AE (3 mg/kg, p.o.) in the TST (A and C, respectively) and on the number of crossings in the open-field test (B and D, respectively). Values are expressed as mean  $\pm$  S.E.M. ( $n=6-7$ ). \*\* $P<0.01$  compared with the vehicle-treated control; # $P<0.01$  compared with the same group pretreated with vehicle.

showed a significant effect of AE (AE treatment:  $F 1.43=78.49$ ,  $P<0.01$  and interaction AE treatment  $\times$  time period:  $F 3.43=4.14$ ,  $P<0.05$ , but not time period:  $F 3.43=1.21$ ,  $P=0.32$ ) in the TST. Fig. 2B shows no changes were observed in the locomotor activity of mice as compared to the control group (Treatment:  $F 1.42=2.25$ ,  $P=0.14$ ; time:  $F 3.42=10.68$ ,  $P<0.01$ ; interaction treatment  $\times$  time:  $F 3.42=0.44$ ,  $P=0.72$ ). Moreover, post hoc analysis showed that AE exhibits similar effect at 1 or 2 h, however its antidepressant-like effect was diminished at 4 h and no longer observed at 12 h.

Since 10 mg/kg of the AE was the lowest acute effective dose (1 h before behavioral analysis), all the experiments regarding the investigation of the mechanisms underlying the antidepressant-like effect of the extract were performed in the TST using this dose.

### 3.2.1. Effect of treatment of mice with NMDA or MK-801 on the antidepressant-like effect of AE in the TST

Fig. 3A shows that the pretreatment of mice with NMDA (0.1 pmol/site, i.c.v.) was able to reverse the antidepressant-like effect of AE (10 mg/kg, p.o.) in the TST (Pretreatment:  $F 1.20=8.40$ ,  $P<0.01$ ; treatment:  $F 1.20=4.03$ ,  $P=0.06$ ; interaction pretreatment  $\times$  treatment:  $F 1.20=16.29$ ,  $P<0.01$ ). The administration of NMDA alone or in combination with AE did not affect the ambulation in the open-field (Fig. 3B) (pretreatment:  $F 1.20=0.10$ ,  $P=0.75$ ; treatment:  $F 1.20=0.74$ ,  $P=0.38$ ; interaction pretreatment  $\times$  treatment:  $F 1.20=0.01$ ,  $P=0.96$ ).

Fig. 3C shows that MK-801 (0.001 mg/kg, i.p.) in combination with a sub-effective dose of AE (3 mg/kg, p.o.) produced an antidepressant-like effect in the TST (pretreatment:  $F 1.20=8.40$ ,

$P<0.01$ ; treatment:  $F 1.20=4.03$ ,  $P=0.06$ ; interaction pretreatment  $\times$  treatment:  $F 1.20=16.29$ ,  $P<0.01$ ). The administration of MK-801 alone or in combination with AE did not affect the ambulation in the open-field (Fig. 3D) (pretreatment:  $F 1.20=0.10$ ,  $P=0.75$ ; treatment:  $F 1.20=0.74$ ,  $P=0.38$ ; interaction pretreatment  $\times$  treatment:  $F 1.20=0.01$ ,  $P=0.96$ ).

### 3.2.2. Effect of pretreatment with L-arginine on the AE induced anti-immobility effect in the TST

The results depicted in Fig. 4A shows that the pretreatment with L-arginine (750 mg/kg i.p., a nitric oxide precursor) prevented the antidepressant-like effect of AE (10 mg/kg, p.o.) in the TST (pretreatment:  $F 1.20=4.73$ ,  $P<0.05$ ; treatment:  $F 1.20=25.68$ ,  $P<0.01$ ; interaction pretreatment  $\times$  treatment:  $F 1.20=1.46$ ,  $P<0.01$ ). The administration of L-arginine alone or in combination with AE did not affect the ambulation in the open-field (Fig. 4B) (pretreatment:  $F 1.20=0.01$ ,  $P=0.91$ ; treatment:  $F 1.20=0.04$ ,  $P=0.84$ ; interaction pretreatment  $\times$  treatment:  $F 1.20=1.07$ ,  $P=0.31$ ).

### 3.2.3. Effects of combined administration of sub-effective doses of the NOS and soluble guanylate cyclase inhibitors and AE in the TST or in the open-field test

Fig. 5A shows that L-NNA (0.3 mg/kg, i.p., a NOS inhibitor) in combination with AE (3 mg/kg, p.o.) produced an anti-immobility effect in the TST as compared with the administration of either drug alone (pretreatment:  $F 1.20=5.87$ ,  $P<0.05$ ; treatment:  $F 1.20=19.46$ ,  $P<0.01$ ; interaction pretreatment  $\times$  treatment:  $F 1.20=14.49$ ,  $P<0.01$ ). The administration of L-NNA alone or in

Please cite this article in press as: Zeni, A.L.B., et al., Antidepressant-like and neuroprotective effects of *Aloysia gratissima*: Investigation of involvement of L-arginine-nitric oxide-cyclic guanosine monophosphate pathway. J. Ethnopharmacol. (2011), doi:10.1016/j.jep.2011.07.009

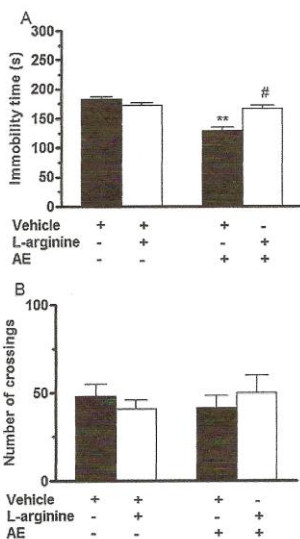


Fig. 4. Effect of the pretreatment of mice with L-arginine (750 mg/kg, i.p., A) on the anti-immobility action of AE (10 mg/kg, p.o.) in the TST (A) and on the number of crossings in the open-field test (B). Values are expressed as mean  $\pm$  S.E.M. (n=6). \*\* $P < 0.01$  compared with the vehicle-treated control; # $P < 0.01$  compared with the same group pretreated with vehicle.

combination with AE did not affect the ambulation in the open-field (Fig. 5B) (pretreatment:  $F_{1,24} = 3.03, P = 0.09$ ; treatment:  $F_{1,24} = 0.31, P = 0.58$ ; interaction pretreatment  $\times$  treatment:  $F_{1,24} = 0.03, P = 0.86$ ).

Fig. 5C shows that methylene blue (20 mg/kg, i.p., direct inhibitor of both nitric oxide synthase and soluble guanylate cyclase) in combination with AE (3 mg/kg, p.o.) also produced an anti-immobility effect in the TST as compared with the administration of either drug alone. The administration of methylene blue (20 mg/kg, i.p.) alone (pretreatment:  $F_{1,23} = 5.82, P < 0.05$ ; treatment:  $F_{1,23} = 18.22, P < 0.01$ ; interaction pretreatment  $\times$  treatment:  $F_{1,23} = 13.1, P < 0.01$ ) or in combination with AE did not affect the ambulation in the open-field (Fig. 5D) (pretreatment:  $F_{1,24} = 1.72, P = 0.20$ ; treatment:  $F_{1,24} = 0.32, P = 0.58$ ; interaction pretreatment  $\times$  treatment:  $F_{1,24} = 0.56, P = 0.46$ ).

The results illustrated in Fig. 5E show the administration of ODOJ (30 pmol/site i.c.v., a selective guanylate cyclase inhibitor) in combination with AE (3 mg/kg, p.o.) produced an antidepressant-like effect as compared with the administration of either drug alone (pretreatment:  $F_{1,24} = 34.15, P < 0.01$ ; treatment:  $F_{1,24} = 38.48, P < 0.01$ ; interaction pretreatment  $\times$  treatment:  $F_{1,24} = 24.77, P < 0.01$ ). Fig. 5F shows that the administration of ODOJ alone or in combination with AE did not affect locomotor activity in the open-field test (Pretreatment:  $F_{1,24} = 1.09, P = 0.31$ ; treatment:  $F_{1,24} = 0.81, P = 0.38$ ; interaction pretreatment  $\times$  treatment:  $F_{1,24} = 3.77, P = 0.06$ ).

### 3.2.4. Effects of pretreatment with sildenafil on the antidepressant-like effect of AE

Fig. 6A shows that the anti-immobility effect of AE (10 mg/kg, p.o.) was completely prevented by pretreatment of animals with sildenafil (5 mg/kg, i.p., an inhibitor of phosphodiesterase 5, PDE5), which *per se* produced no effect in the TST (pretreatment:  $F_{1,20} = 14.32, P < 0.01$ ; treatment:  $F_{1,20} = 17.03, P < 0.01$ ; interaction pretreatment  $\times$  treatment:  $F_{1,20} = 10.91, P < 0.01$ ). The administration of sildenafil (5 mg/kg, i.p.) alone or in combination with AE did not affect the locomotor activity in the open-field (Fig. 6B) (pretreatment:  $F_{1,20} = 0.51, P = 0.48$ ; treatment:  $F_{1,20} = 0.44, P = 0.51$ ; interaction pretreatment  $\times$  treatment:  $F_{1,20} = 2.43, P = 0.13$ ).

### 3.3. Neuroprotective effect of AE against glutamate-induced toxicity

The incubation of hippocampal slices for 1 h with glutamate (10 mM, *in vitro*) significantly reduced the cell viability, assessed by MTT reduction, when compared to control slices. Glutamate-induced hippocampal slice damage was not observed in hippocampal slices obtained from mice previously treated (1 h before decapitation of mice and slices preparation) with AE as an *ex vivo* evaluation of the neuroprotective effect of AE (10 mg/kg) (Fig. 7).

### 3.4. AE prevents glutamate-induced decreased of Akt phosphorylation and increase of iNOS immunoreaction

Fig. 8 shows that glutamate induced a decrease in Ser-473Akt phosphorylation in hippocampal slices obtained from mice previously treated with vehicle (*ex vivo* experiment). On the contrary, glutamate was unable to cause this effect in slices obtained from mice previously treated with AE (10 mg/kg, p.o., 1 h before slices preparation). These results suggest that the activation of the PI3K/Akt pathway is implicated in the protection afforded by AE. No significant alteration was observed in total Akt protein immunoreaction.

In addition, Fig. 9 shows a glutamate-induced increase in the iNOS expression in hippocampal slices obtained from mice previously treated with vehicle. Also, glutamate was unable to cause this effect in slices obtained from mice previously treated with AE (10 mg/kg, p.o., 1 h before slices preparation).

## 4. Discussion

In the present study, we demonstrated for the first time that acute AE orally administered is effective in producing significant antidepressant-like effect in PST and TST, without modifying the motor performance of mice. Moreover, an *ex vivo* evaluation of glutamatergic toxicity in hippocampal slices obtained from pretreated mice showed that AE is also neuroprotective to hippocampal damage induced by glutamate.

The FST and TST are widely accepted stress models of depression used to screen new antidepressant drugs, as they are sensitive to all major classes of antidepressant drugs including tricyclics, serotonin-selective reuptake inhibitors, monoamine oxidase inhibitors, and atypical (Porsolt et al., 1977; Steru et al., 1985). However, these tests do not have an identical neurochemical basis (Bai et al., 2001). Therefore, the fact that AE administration is active in both tests reinforces the assumption that AE might play a role in the modulation of depression. However, AE caused a biphasic ('bell-shaped') dose-response curve in the TST, but did not produce this effect in the dose range tested in the FST. Indeed, a bell-shaped dose-response profile for several compounds has been reported in the TST, such as for 5,6-dibromo-N,N-dimethyltryptamine, a marine natural compound,

Please cite this article in press as: Zeni, A.L.B., et al., Antidepressant-like and neuroprotective effects of *Aloystia grattissima*: Investigation of involvement of L-arginine-nitric oxide-cyclic guanosine monophosphate pathway. J. Ethnopharmacol. (2011), doi:10.1016/j.jep.2011.07.009

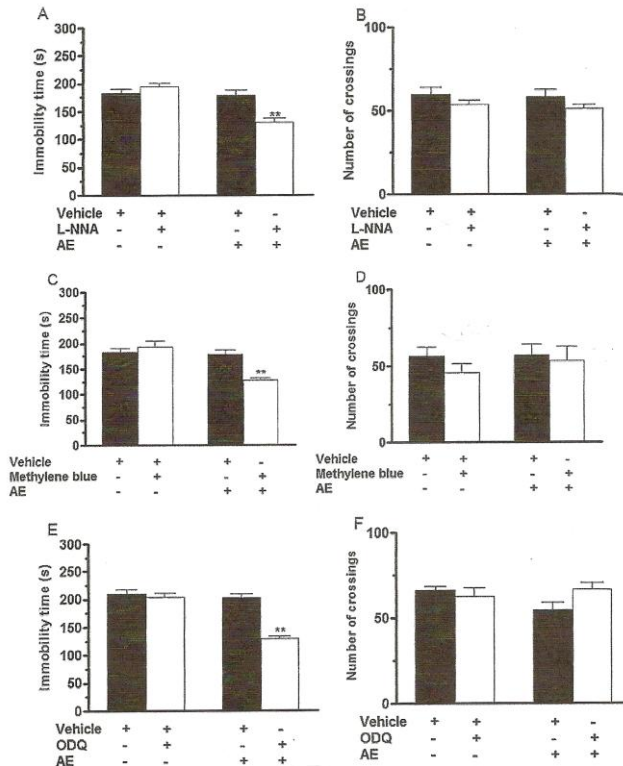
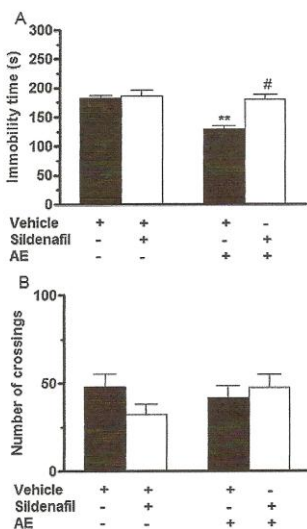


Fig. 5. Effect of L-NNA (0.3 mg/kg, i.p.), methylene blue (20 mg/kg, i.p.) or ODQ (30 pmol/site, i.c.v.) in combination with a sub-effective dose of AE (3 mg/kg, p.o.) in the TST in mice (A, C and E, respectively) and in the open-field test (B, D, and F, respectively). Values are expressed as mean  $\pm$  S.E.M. (n=6–7). \*\*P<0.01 compared with the vehicle-treated control group.

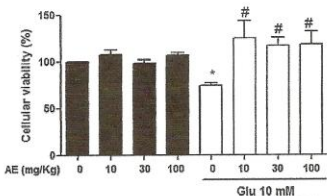
and nortriptyline hydrochloride (Oliveira et al., 1990; Diers et al., 2008). Therefore, the FST is generally recommended for a screen of antidepressant-like effects, and a drug showing positive effects should then be further tested in the TST (Cryan et al., 2002). It has also been proposed that the TST is less stressful than the FST and possesses greater pharmacological sensitivity to lower doses of antidepressant (Thierry et al., 1986). Accordingly, the antidepressant-like effect of AE was observed at lower doses in TST than FST. Moreover, the antidepressant-like effect of 10 mg/kg AE in the TST was observed until 4 h of administration, an interesting prolonged effect as compared *Tabebuia ovalifera*, another plant extract which presents antidepressant-like effect in TST (Fretas et al., 2010).

The involvement of NMDA receptors and the L-arginine-NO-cGMP pathway in antidepressant-like activity of AE and the ability of AE treatment (*ex vivo* experiments) to prevent glutamate-induced toxicity in hippocampal slices were evaluated.

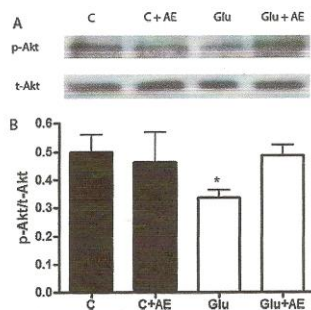
The involvement of glutamate in the pathophysiology of depression has been suggested in several studies (for review, see Sanacora et al., 2008). Increased levels of glutamate in the frontal cortex in postmortem samples (Hashimoto et al., 2007) and in the plasma of patients with depression (Mauri et al., 1998) have been reported. Additionally, NMDA receptor antagonists possess antidepressant properties and conventional antidepressants have been reported to reduce the binding, expression and function of NMDA receptors (Skolnick, 1999; Sanacora et al., 2008). The reversal of the



**Fig. 6.** Effect of the pretreatment of mice with sildenafil (5 mg/kg, i.p.) on the anti-immobility effect of AE (10 mg/kg, p.o.) in the TST (A) and on the number of crossings in the open-field test (B). Values are expressed as mean  $\pm$  S.E.M. (n=6). \*\*P<0.01 compared with the vehicle-treated control; #P<0.01 compared with the same group pretreated with vehicle.

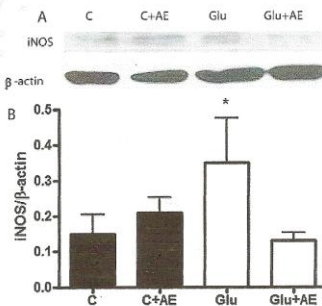


**Fig. 7.** Ex vivo cell viability analysis in hippocampal slices incubated with glutamate (Glu, 10 mM) for 1 h. When present, AE (10, 30 or 100 mg/kg) was pre-administered in mice by gavage (1 h before slices preparation). After this period, incubation media was withdrawn and replaced for fresh culture medium without Glu and maintained for additional 6 h. Control group (C, first black bar) was considered as 100% and other black bars represents cell viability of slices incubated only in culture medium. White bars represents the cell viability of hippocampal slices subjected to glutamate. The values represent mean  $\pm$  SD of at least 5 experiments carried out in triplicates. Mean significantly different from control group (100%); P<0.05. #Mean significantly different from Glu group; P<0.05.



**Fig. 8.** AE treatment increases Akt phosphorylation in hippocampal slices. AE treatment (10 mg/kg) 1 h before glutamate (10 mM) significantly increases Akt phosphorylation at Ser<sup>473</sup>. (A) Representative Western blot of phosphorylated (p-Akt) and total content of Akt protein (t-Akt), 56 kDa; (B) The ratio of phosphorylated Akt/total Akt signal (p-Akt/t-Akt). The optical densities of bands were measured by Scion Image software. Data in bars are presented as mean  $\pm$  SD of 4 experiments carried out in triplicate. \*P<0.05 compared with control (C) group.

antidepressant-like effect of AE by NMDA suggests its effect is dependent on the inhibition of NMDA receptor activation. Besides, we observed that the co-administration of MK-801 and AE produced a synergistic antidepressant-like effect. The dose of MK-801 used in the present study was previously shown to cause no effect in the open-field test, but it was able to cause a synergistic antidepressant-like effect with folic acid in the FST (Procaccio et al., 2008). Moreover, it has been shown that fluoxetine and desipramine inhibit NMDA receptors at clinically relevant concentration range (Szász et al., 2007), a finding that indicates that glutamatergic, noradrenergic and serotonergic systems interact in the mechanism of action of antidepressants (Forsay et al., 1999;



**Fig. 9.** AE treatment decreases INOS expression in hippocampal slices. AE treatment (10 mg/kg) 1 h before glutamate (10 mM) significantly decreases INOS expression. (A) Representative Western blotting of INOS (130 kDa) and  $\beta$ -actin (30 kDa) immunoprecipitated used as loading control to western blot analysis. (B) The ratio of INOS/ $\beta$ -actin signal (INOS/ $\beta$ -actin). The optical density of bands was measured by Scion Image software. Data in bars are presented as mean  $\pm$  SD of 4 experiments carried out in triplicate. \*P<0.05 compared with control (C) group.

136

Please cite this article in press as: Zeni, A.L.B., et al., Antidepressant-like and neuroprotective effects of *Aloysia gratissima*: Investigation of involvement of L-arginine-nitric oxide-cyclic guanosine monophosphate pathway. J. Ethnopharmacol. (2011), doi:10.1016/j.jep.2011.07.009

Maura et al., 2000; Bonanno et al., 2005; Szasz et al., 2007). In addition, it was recently reported that the antidepressant-like effect of escitalopram in the FST was reversed by NMDA pretreatment in mice (Zomkowski et al., 2010).

Due to the existence of data indicating that the NO-cGMP pathway is involved in the pathophysiology of depression (Harkin et al., 1999; Kaster et al., 2005; Zomkowski et al., 2010) and also the fact that the activation of NMDA receptors is directly associated with the activation of NOS in the central nervous system, the involvement of this pathway in the antidepressant-like effect of AE was investigated. We showed that the pretreatment with L-arginine, a substrate for NOS, significantly inhibited the anti-immobility effect caused by AE. Our results are in accordance with studies that have shown that NOS inhibitors (Wegener et al., 2003) and reduction of NO levels within the hippocampus can induce antidepressant-like effects, thus implicating endogenous hippocampal NO in the neurobiology of depression (Joca and Guimarães, 2006). Similarly to our results, the antidepressant-like effects of escitalopram, paroxetine, and venlafaxine were also blocked by pretreatment with L-arginine (Dhir and Kulkarni, 2007; Chasemi et al., 2009; Zomkowski et al., 2010). These results indicate that the effect of AE in the TST may be dependent on, at least in part, the inhibition of NO synthesis.

The assumption that the L-arginine-NO-cGMP pathway is involved in the reduction in the immobility time elicited by AE is reinforced by the finding that L-NNA (an inhibitor of NOS), ODQ (a selective, irreversible, heme-site inhibitor of sGC) or methylene blue (an inhibitor of both NOS and sGC), produced a synergistic antidepressant-like effect with AE. Accordingly, it has been reported that inhibitors of NOS or sGC potentiated the effect of adenosine, venlafaxine (Kaster et al., 2005; Dhir and Kulkarni, 2007), escitalopram and memantine (Almeida et al., 2006; Zomkowski et al., 2010) in the FST. Hence, our results also suggest that the antidepressant-like effect of AE may be mediated through the reduction of cGMP, as a consequence of the reduction of NO synthesis, reinforcing the notion that cGMP is an important molecular target for antidepressant action.

Noteworthy, the reversal of the antidepressant-like effect of AE caused by pretreatment with sildenafil, a selective PDE5 inhibitor, further indicates that AE exerts its effect in the TST by decreasing cGMP levels. The intracellular cGMP concentrations are regulated not only by sGC, but also by PDE, which catalyses the hydrolysis of the second messengers cAMP and cGMP. The duration and magnitude of a NO-induced cGMP signal are determined by the activity of PDE5 (Beavo, 1995). Accordingly, the antidepressant-like effect of memantine (Almeida et al., 2006), venlafaxine (Dhir and Kulkarni, 2007), folic acid (Brocardo et al., 2008), and escitalopram (Zomkowski et al., 2010) was prevented by sildenafil.

Moreover, the results obtained in the *ex vivo* experiments with hippocampal slices show that AE exerts neuroprotection against the glutamate excitotoxicity. Hippocampal slices exposed to 10 mM glutamate presented reduced cell viability, which was not observed in slices prepared from mice previously treated with AE (10 mg/kg, p.o.). According to Molz et al. (2008), glutamate at this concentration causes hippocampal cells death by apoptosis, which was completely blocked by MK-801.

Several signaling pathways have been reported to be involved in the mechanism of action of neuroprotective agents, with special attention to the phosphoinositide 3-kinase (PI3K)/Akt signaling pathway. Akt is a serine–threonine kinase activated by PI3K phosphorylation implicated in cell growth, migration, and survival (Cantley, 2002), and directly related to neuroprotection against glutamate-induced toxicity (Piermarini et al., 2009). In the present study, the neuroprotection afforded by AE (10 mg/kg) against excitotoxicity seems to be mediated by activation of Akt signaling and recovery of cell viability in hippocampal slices. In addition, Akt sig-

naling has been shown to be implicated in the mechanism of action of antidepressant drugs (Beaulieu et al., 2009).

Furthermore, we observed that glutamate (10 mM) also increased the iNOS expression in hippocampal slices. Noteworthy, this effect was not observed in slices prepared from mice previously treated with AE. Since AE is rich in kauranes, flavonoids, and phenylethanoids (Silva et al., 2006) and possesses antioxidant activity (Rosas-Romero and Saavedra, 2005) we cannot rule out an action of these molecules in the mechanism of neuroprotection afforded by AE and further investigations will be carried out to clarify this issue.

Therefore, considering the effects of AE herein shown, it is feasible to suggest that the antidepressant-like action of AE might be related to its neuroprotective action in the hippocampus, which is consistent with the relationship between hippocampal damage and depressive disorders (Sapolsky, 2000). Altogether, our results positively support the traditional use of *Aloysia gratissima* in South America folk medicine. Studies are being carried out in our laboratories to discriminate additional activities of aqueous extract and the constituents of *Aloysia gratissima* upon the central nervous system, as well as to clarify their mechanisms of action.

## 5. Conclusion

The results of the present study revealed that AE exerted an antidepressant-like effect in the FST and TST. In addition, the antidepressant-like effect was shown to be dependent on its interaction with NMDA receptors and L-arginine-NO-cGMP pathway. Moreover, AE protected hippocampal slices against glutamate excitotoxicity through activation of Akt pathway and decrease of iNOS expression. Altogether, the results indicate that *Aloysia gratissima* may be of interest as a plant species source for therapeutic agent for the treatment of depressive disorders and neurodegeneration.

## Acknowledgements

This study was supported by grants from the Brazilian funding agencies: CNPq, CAPES, FAPESC, FINEP-IBN/Net (01.06.0842-00) and INCT-EN.A.L.S. Rodrigues, C.I. Tascia and M. Maraschin are recipients of CNPq fellowship.

## References

- Almeida, R.C., Felisbino, C.S., López, M.G., Rodrigues, A.L.S., Gabilan, N.H., 2006. Evidence for the involvement of L-arginine-nitric oxide-cyclic guanosine monophosphate pathway in the antidepressant-like effect of memantine in mice. *Behavioural Brain Research* 68, 318–322.
- Arias Toledo, B., 2009. Diversidad de usos, prácticas de recolección y diferencias según género y edad en el uso de plantas medicinales en Córdoba, Argentina. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas* 8, 389–401.
- Bal, F., Li, X., Clay, M., Lindstrom, T., Skolnick, P., 2001. Intra and interstrain differences in models of "behavioral despair". *Pharmacology Biochemistry and Behaviour* 70, 187–192.
- Beaulieu, J.M., Gainetdinov, R.R., Caron, M.G., 2009. Akt/GSK3 signaling in the action of psychotropic drugs. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 49, 327–347.
- Beavo, J.A., 1995. Cyclic nucleotide phosphodiesterases: functional implications of multiple isoforms. *Physiological Reviews* 75, 725–748.
- Beron, O., Nestler, E.J., 2008. New approaches to antidepressant drug discovery: beyond monoamines. *Nature Reviews Neuroscience* 7, 137–151.
- Bonanno, G., Giambelli, R., Ralteri, L., Tiraboschi, E., Zappertini, S., Musazzi, L., Ralteri, M., Racagni, G., Popoli, M., 2005. Chronic antidepressants reduce depolarization-evoked glutamate release and protein interactions favoring formation of SNARE complex in hippocampus. *Journal of Neuroscience* 25, 3270–3279.
- Borsini, F., Meli, A., 1988. Is the forced swimming test a suitable model for revealing antidepressant activity? *Psychopharmacology* 94, 147–160.
- Brocardo, P.S., Butini, J., Kaster, M.P., Santos, A.R.S., Rodrigues, A.L.S., 2008. Folic acid administration produces an antidepressant-like effect in mice: evidence for the involvement of the serotonergic and noradrenergic systems. *Neuropharmacology* 54, 464–473.
- Bruneiro, N., Mendlewicz, J., Kasper, S., Leonard, B., Montgomery, S., Nelson, J., Paykel, E., Versiani, M., Racagni, G., 2002. The role of noradrenaline and selective noradrenaline reuptake inhibition in depression. *European Neuropharmacology* 12, 461–475.

- Cantley, L.C., 2002. The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science* 296, 1655-1657.
- Cryan, J.F., Markou, A., Lucki, L., 2002. Assessing antidepressant activity in rodents: recent developments and future needs. *Trends in Pharmacological Sciences* 23, 238-245.
- Dellacasa, A.D., Baillic, P.N., Ponzi, M.L., 2003. In vitro activity of essential oils from San Luis-Argentina against *Ascothra aptis*. *Journal of Essential Oil Research* 15, 282-285.
- Dhir, A., Kulkarni, S.K., 2007. Involvement of nitric oxide (NO) signaling pathway in the antidepressant action of bupropion, a dopamine reuptake inhibitor. *European Journal of Pharmacology* 568, 177-185.
- Diers, J.A., Ivey, K.D., El-Alfy, A., Shahil, J., Wang, J., Kochanowski, A.J., Stoker, J.F., Hamann, M.T., Matsumoto, R.R., 2008. Identification of antidepressant drug leads through the natural products with neuropharmacological pharmacophores. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 89, 46-53.
- Duschatzky, C.B., Martinez, A.N., Almeida, N.V., Bonivardo, S.L., 2004. Nematicidal activity of the essential oils of several Argentinian plants against the root-knot nematode. *Journal of Essential Oil Research* 16, 626-628.
- Espigues, J.V., 2002. NO as a signalling molecule in the nervous system. *British Journal of Pharmacology* 135, 1079-1095.
- Ferray, M.J., Bustos, C., Cysling, K., 1989. Noradrenaline inhibits glutamate release in the rat bed nucleus of the stria terminalis: in vivo microdialysis studies. *Journal of Neuroscience Research* 55, 311-320.
- Franklin, K.B.J., Paxinos, G., 2001. *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*, 2nd ed. Academic Press, San Diego.
- Freitas, A.F., Budni, J., Lobato, R.R., Binafre, R.W., Machado, D., Jacimo, J., Veronezi, P.D., Pizzolati, M.C., Rodrigues, A.L.S., 2010. Antidepressant-like effect of the ethanolic extract from *Tobatisia evolvuloides* in mice: evidence for the involvement of the monoaminergic system. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry* 34, 335-343.
- García, C.C., Tajariro, L., Almeida, N., Colombres, S., Duschatzky, C., Damonte, E.B., 2003. Virucidal activity of essential oils from aromatic plants of San Luis, Argentina. *Phytotherapy Research* 17, 1073-1075.
- Ghaseini, M., Montazer-Koubarsi, L., Shafarodi, H., Nezami, B.G., Ebrahimi, F., Dehpour, A.R., 2009. NMDA/receptor nitergic system blockage augments antidepressant-like effects of paroxetine in the mouse forced swimming test. *Psychopharmacology* 206, 325-333.
- Harkin, A.J., Bruce, K.R., Craft, B., Paul, I.A., 1999. Nitric oxide synthase inhibitors have antidepressant-like properties in mice. Acute treatments are active in the forced swim test. *European Journal of Pharmacology* 372, 207-213.
- Hashimoto, K., Sawo, A., Ito, M., 2007. Increased levels of glutamate in brains from patients with mood disorders. *Biological Psychiatry* 25, 1310-1316.
- Hellóin-Ibarrola, M.C., Ibarrola, D.A., Montalbetti, V., Kennedy, M.L., Heinrich, O., Campuzano, M., Torriello, J., Fernández, S., Wasowski, C., Marder, M., De Lima, T.C.M., Mora, S., 2006. The anxiolytic-like effect of *Aloysia polytrichia* (Griseb.) Molkenbe (Verbenaceae) in mice. *Journal of Ethnopharmacology* 105, 400-408.
- Hellóin-Ibarrola, M.C., Ibarrola, D.A., Montalbetti, V., Kennedy, M.L., Heinrich, O., Campuzano, M., Ferro, E.A., Awarenga, N.T., Torriello, J., De Lima, T.C.M., Mora, S., 2008. The antidepressant-like effect of *Aloysia polytrichia* (Griseb.) Molkenbe (Verbenaceae) in mice. *Phytomedicine* 15, 478-483.
- Joca, S.R., Guimarães, F.S., 2006. Inhibition of neuronal nitric oxide synthase in the rat hippocampus induces antidepressant-like effects. *Psychopharmacology* 185, 298-302.
- Kaster, M.P., Rosa, A.O., Santos, A.R.S., Rodrigues, A.L.S., 2005. Involvement of nitric oxide-cGMP pathway in the antidepressant-like effects of adenosine in the forced swimming test. *International Journal of Neuropharmacology* 8, 601-606.
- Laakmann, C., Diene, A., Kleser, M., 1998. Clinical significance of hyperforin for the efficacy of hypericum extracts on depressive disorders of different severities. *Phytomedicine* 5, 435-442.
- Laursen, S.E., Belknap, J.K., 1986. Intracerebroventricular injections in mice. *Journal of Pharmacological Methods* 16, 355-357.
- Linde, K., Knuppel, L., 2005. Large-scale observational studies of hypericum extracts in patients with depressive disorders - a systematic review. *Phytomedicine* 12, 148-157.
- MacCalligary, S., Arroll, B., Hatcher, S., Ogston, S., Reid, I., Sullivan, F., Williams, B., Crombie, L., 2003. Efficacy and tolerability of selective serotonin reuptake inhibitors compared with tricyclic antidepressants in depression treated in primary care: a systematic review and meta analysis. *British Medical Journal* 326, 1014.
- Machado, D.C., Kaster, M.P., Binafre, R.W., Dias, M., Santos, A.R.S., Pizzolati, M.C., Brighente, I.M.C., Rodrigues, A.L.S., 2007. Antidepressant-like effect of the extract from leaves of *Schinus molle* L. in mice: evidence for the involvement of the monoaminergic system. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry* 31, 421-428.
- Maeng, S., Zarate Jr., C.A., 2007. The role of glutamate in mood disorders: results from the ketamine in major depression study and the presumed cellular mechanism underlying its antidepressant effects. *Current Psychiatry Reports* 9, 467-474.
- Maura, G., Marcoli, M., Piccinelli, G., Rossi, C., Viola, C., Baiardi, M., 2000. Serotonin inhibition of the NMDA receptor/nitric oxide/cyclic GMP pathway in human neocortex slices: involvement of 5-HT<sub>2C</sub> and 5-HT<sub>1A</sub> receptors. *British Journal of Pharmacology* 130, 1853-1858.
- Mauri, M.C., Ferrara, A., Boscali, L., Bravin, S., Zamberlan, F., Alecci, M., Invernizzi, C., 1998. Plasma and platelet amino acid concentrations in patients affected by major depression and under fluvoxamine treatment. *Neuropsychobiology* 37, 124-129.
- Molz, S., Decker, H., Dal-Cim, T., Cremonese, C., Cordova, F.M., Leal, R.H., Tasca, C.I., 2008. Glutamate-induced toxicity in hippocampal slices involves apoptotic features and p38<sup>MAPK</sup> signaling. *Neurochemical Research* 33, 27-36.
- Mora, S., Diaz-Véliz, G., Millán, R., Lungenstrass, H., Quirós, S., Coto-Morales, T., Hellóin-Ibarrola, M.C., 2005. Anxiolytic and antidepressant-like effects of the hydroalcoholic extract from *Aloysia polytrichia* in rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 82, 373-378.
- Mosmann, T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity. *Journal of Immunological Methods* 65, 55-63.
- Nemeroff, C.B., 2007. The burden of severe depression: a review of diagnostic challenges and treatment alternatives. *Journal of Psychiatric Research* 41, 189-206.
- Oliveira, I.J.L., Molz, S., Souza, D.O., Tasca, C.I., 2002. Neuroprotective effect of GMP in hippocampal slices submitted to an in vitro model of ischemia. *Cellular and Molecular Neurobiology* 22, 335-344.
- Oliveira, I.R., Meersch, B.V., Dardennes, R., Gonidec, J., Gonidec, J., Prado-Lima, P.A., 1990. Self-inhibiting action of nortriptyline's anti-immobility effect at high plasma and brain levels in mice. *Psychopharmacology* 102, 553-556.
- Peterson, G.L., 1977. A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Analytical Biochemistry* 83, 346-356.
- Pierantoni, A.E., Vendrelin-Filoso, S., Herculano, B.A., Martins, W.C., DaFagnolo, D., Stroeh, F., Carqueja, C.L., Borek, C.R., Tasca, C.I., 2008. Atorvastatin prevents hippocampal cell death due to quinolinic acid-induced seizures in mice by increasing Akt phosphorylation and glutamate uptake. *Neurotoxicology Research* 16, 106-115.
- Porcoli, R.D., Le Pichon, M., Jalife, M., 1977. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature* 266, 720-723.
- Rodrigues, A.L.S., Silva, G.L., Matteucci, A.S., Fernandes, E., Miguel, O., Yunes, R.A., Calixto, J.B., Santos, A.R.S., 2002. Involvement of monoaminergic system in the antidepressant-like effect of the hydroalcoholic extract of *Siphocampylus verticillatus*. *Life Sciences* 70, 1347-1358.
- Rosa, A.O., Souza, C., Saavedra, C., 2005. Screening Bolivian plants for antioxidant activity. *Pharmaceutical Biology* 43, 79-86.
- Rush, A.J., Trivedi, M., Fava, M., 2003. Depression. IV: STAR\*D treatment trial for depression. *American Journal of Psychiatry* 160, 237.
- Sakalita, H., Ishida, K., Grundmann, O., Nakajima, J.L., Sen, S., Butterweck, V., Minami, Y., Salto, S., Kawai, Y., Nakaya, Y., Terao, J., 2006. Antidepressant effect of extracts from *Ginkgo biloba* leaves in behavioral models. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 29, 1767-1770.
- Samaeça, G., Zarate Jr., C.A., Kryzaj, J., Manji, H.K., 2008. Targeting the glutamatergic system to develop novel, improved therapeutics for mood disorders. *Nature Reviews Drug Discovery* 7, 426-437.
- Sapolsky, R.M., 2000. The possibility of neurotoxicity in the hippocampus in major depression: a primer on neuron death. *Biological Psychiatry* 48, 755-765.
- Silva, C.C., Vandresen, F., Oliveira, C.M.A., Kato, L., Tanaaka, C.M.A., Ferreira, H.E., 2006. Chemical composition of *Aloysia gratissima* (Gill et Hook) Tronc. (Verbenaceae). *Biochemical Systematics and Ecology* 34, 593-595.
- Skolnick, P., 1988. Antidepressant for the new millennium. *European Journal of Pharmacology* 375, 31-40.
- Souza, A.A., Wiest, J.M., 2007. Atividade antibacteriana de *Aloysia gratissima* (Gill et Hook) Tronc. (garupa, crva-santa), usada na medicina tradicional no Rio Grande do Sul - Brasil. *Brazilian Journal of Medicinal Plants* 9, 223-228.
- Steru, L., Chermat, R., Thierry, B., Simon, P., 1985. The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. *Psychopharmacology* 85, 367-370.
- Szasz, R.K., Milke, A., Karoly, R., Gerevich, Z., Illes, P., Vizi, E.S., Kiss, J.P., 2007. Direct inhibitory effect of flusoxetine on N-methyl-D-aspartate receptors in the central nervous system. *Biological Psychiatry* 62, 1303-1309.
- Thierry, B., Steru, L., Simon, P., Porcoli, R.D., 1986. The tail suspension test: ethical considerations. *Psychopharmacology* 90, 284-285.
- Ullak, G., Mutlu, O., Aklar, F.Y., Komsuoglu, F.L., Tanerli, P., Erden, F.B., 2008. Neuronal NOS inhibitor 1-[2-(trifluoromethyl)phenyl]-imidazole augment the effects of antidepressants acting via serotonergic system in the forced swimming test in rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 90, 563-568.
- Vandresen, F., Schmitt, E., Kato, L., Oliveira, C.M.A., Amado, C.A.B., Silva, C.C., 2010. Constituintes químicos e avaliação das atividades antibacteriana e antiematogênica de *Aloysia gratissima* (Gillies & Hook.) Tronc. e *Aloysia virgate* (Ruiz & Pav.) Pers. *Verbenaceae*. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 20, 317-321.
- Vendruscolo, G.S., Simões, C.M.O., Nizeta, L.A., 2005. Etnobotânica no rio grande do sul: análise comparativa entre o conhecimento original e atual sobre as plantas medicinais nativas. *Pesquisas, Botânica* 56, 285-322.
- Wasowski, C., Marder, M. Central nervous system activities of two diterpenes isolated from isolated from *Aloysia virgate*. *Phytomedicine*, in press.
- Weggen, G., Volske, V., Harvey, R.H., Rosenzberg, R., 2003. Local, but not systemic, administration of serotonergic antidepressants decreases hippocampal nitric oxide synthase activity. *Brain Research* 959, 128-134.
- Zarate, C.A., Singh, J.B., Carlson, P.J., Brutsche, N.E., Ameli, R., Luckenbaugh, D.A., Charney, D.S., Manji, H.K., 2005. A randomized trial of an N-methyl-D-aspartate antagonist in treatment-resistant major depression. *Archives of General Psychiatry* 63, 856-864.
- Zhang, Z.J., 2004. Therapeutic effects of herbal extracts and constituents in animal models of psychiatric disorders. *Life Sciences* 75, 1659-1628.
- Zimkowski, A.D.E., Engel, D., Cabian, N.H., Rodrigues, A.L.S., 2010. Involvement of NMDA receptors and L-arginine-nitric oxide-cyclic guanosine monophosphate pathway in the antidepressant-like effects of escitalopram in the forced swimming test. *European Neuropsychopharmacology* 20, 793-801.

Please cite this article in press as: Zeni, A.L.B., et al., Antidepressant-like and neuroprotective effects of *Aloysia gratissima*: Investigation of involvement of L-arginine-nitric oxide-cyclic guanosine monophosphate pathway. *J. Ethnopharmacol.* (2011), doi:10.1016/j.jep.2011.07.009

## **CAPÍTULO 6**

### ***EVIDENCE OF THE INVOLVEMENT OF THE MONOAMINERGIC SYSTEM IN THE ANTIDEPRESSANT-LIKE EFFECT OF ALOYSIA GRATISSIMA***

Manuscrito a ser submetido à revista Progress in Neuro-  
Psychopharmacology & Biological  
Psychiatry



## **CAPÍTULO 7**

### ***FERULIC ACID EXERTS ANTIDEPRESSANT-LIKE EFFECT IN THE TAIL SUSPENSION TEST IN MICE: EVIDENCE FOR THE INVOLVEMENT OF THE SEROTONINERGIC SYSTEM***

Manuscrito submetido à revista European Journal of  
Pharmacology

## **CAPÍTULO 8**

### ***INVOLVEMENT OF PKA, CAMKII, PKC, MAPK/ERK AND PI3K IN THE ACUTE ANTIDEPRESSANT-LIKE EFFECT OF FERULIC ACID IN THE TAIL SUSPENSION TEST***

Manuscrito a ser submetido à revista Behavioural Brain  
Research

## 2 DISCUSSÃO GERAL

Na natureza existe uma biodiversidade de organismos que geram substâncias com uma variada diversidade molecular e funcional, o que proporciona uma alta probabilidade de interação com moléculas-alvos de outros organismos, como os seres humanos. Diante deste quadro, produtos naturais foram e são investigados na procura por agentes terapêuticos seguros e eficazes. No presente estudo foi investigado o extrato aquoso de *Aloysia gratissima* (EA) e o ácido ferúlico (AF), composto fenólico majoritário do EA, ambos como possíveis agentes terapêuticos. O estudo do EA avaliou o perfil fitoquímico, principalmente de polifenóis e carotenóides, toxicidade aguda e, as atividades antioxidante, neuroprotetora e tipo antidepressiva, bem como, possíveis mecanismos de ação. Em relação ao AF, foi investigado o seu efeito tipo antidepressivo e alguns potenciais mecanismos responsáveis por este efeito.

Dados da literatura mostram que *A. gratissima* possui compostos químicos como os, cauranos, flavonóides e fenilpropanóides (Silva et al., 2006). Além disso, Vandresen et al (2010) isolaram,  $\alpha$ -bisabolol, triterpenos como,  $\alpha$ -amirina, ácido betulínico, ácido oleanólico e ácido ursólico e, os flavonóides, genkwanina; 5-hidróxi-7,4'- dimetoxiapigenina; 5-hidróxi-7,3',4'-trimetoxiluteolina e rutina. Neste estudo identificamos e quantificamos polifenóis e carotenóides, que são conhecidos principalmente por suas propriedades antioxidantes e fotoprotetoras (Taylor et al., 2006). Polifenóis e carotenóides têm sido relacionados à diminuição de risco para diversas doenças como o câncer, doenças cardiovasculares e neurodegenerativas.

A investigação fitoquímica do EA abrangeu amostras de biomassa foliar e de ramos das 4 estações do ano, que mostraram um perfil que diferiu quantitativa, mas não qualitativamente. Os resultados obtidos mostraram que, as variações de condições ambientais como, temperatura máxima e mínima, umidade relativa do ar, chuva acumulada e dias com chuva, foram responsáveis pelas mudanças nos níveis quantitativos de, ácidos fenólicos (vanílico, clorogênico, ferúlico, caféico e gálico) e carotenóides (*trans*- $\alpha$ -caroteno). Resultados semelhantes foram obtidos com *Hypericum brasiliense* por Abreu & Mazzafera (2005). Nossos resultados demonstraram que as maiores concentrações de polifenóis e carotenóides de uma forma geral

acontecem no outono, com destaque para, os fenóis ácidos, derivados do ácido hidroxicinâmico, principalmente o ácido ferúlico mas, também os ácidos, *trans*-cinâmico e *p*-cumárico e, o carotenóide, luteína, ambos os grupos conhecidos pelas propriedades antioxidantes (Cheng et al., 2007; Taylor et al, 2006).

O AF é encontrado comumente em tecidos suberizados, como cascas de frutos e galhos, protegendo da excessiva perda de água e nutrientes, radiação e, invasão por patógenos (Raven et al., 2001). Neste estudo o rendimento do EA no outono foi maior do que nas outras estações do ano e o AF foi encontrado em maior quantidade. Estes resultados juntamente com os dados da literatura sugerem que o AF colabora na preparação da planta para a diminuição do metabolismo e queda de folhas no inverno.

A fim de verificar a existência de correlação entre os polifenóis e o efeito antioxidante do EA foi realizada uma avaliação que mostrou que existe uma alta correlação, entre polifenóis totais e EA, similar ao observado por Katsube et al. (2004) e Liu et al. (2008) e, entre EA e a atividade antioxidante, semelhante ao encontrado para a *Matricaria chamomilla* L. e, superior ao detectado para *Camellia sinensis* L. (Moraes de Souza et al., 2008), ambos os extratos com alta quantidade de polifenóis e atividade antioxidante. No entanto, neste estudo não pode ser descartada a contribuição de outras substâncias do EA no efeito antioxidante observado.

No presente estudo também foi avaliada a capacidade antioxidante sobre lipídios do EA utilizando uma matriz biológica, o homogenato de cérebro. A administração do EA aos animais foi capaz de diminuir significativamente a peroxidação lipídica, confirmando assim a atividade antioxidante. Porém, EA não foi capaz de aumentar os níveis de tióis protéicos livres e, considerando que os compostos majoritários do extrato são essencialmente apolares, estas dados sugerem um efeito mais localizado em nível de membranas celulares. Em relação à importância deste efeito, a peroxidação de lipídios é diretamente responsável pela geração de fenótipos apoptóticos (Kagan et al., 2000), diminuindo a atividade de peroxidases e impedindo sua ação oxidativa junto à superfície da membrana plasmática (Bayir, et al., 2006). De fato, o EA demonstrou capacidade de reduzir a peroxidação lipídica e apresentou polifenóis e carotenóides em sua composição

química. Entretanto, um estudo mais detalhado sobre a sua ação antioxidante precisa ser desenvolvido.

Devido à inexistência de dados toxicológicos relacionados ao uso do EA, uma avaliação foi realizada a fim de verificar um possível efeito tóxico. O conjunto de experimentos realizados demonstrou que o uso oral e agudo do EA (100 – 1000 mg/kg) em camundongos, não apresenta efeitos tóxicos, não tendo sido observadas alterações significativas nos parâmetros, comportamental, fisiológico, bioquímico, hematológico e morfológico. A na análise histopatológica do grupo 2000 mg/kg mostrou toxicidade, considerada leve, no fígado, não ocorrendo o mesmo nos outros órgãos analisados.

Considerando a presença de compostos fenólicos e carotenóidicos no EA, com potencial efeito antioxidante e a ausência de toxicidade do EA *in vivo*, foi estudado um possível efeito neuroprotetor do EA, em fatias de hipocampo de ratos. Neste estudo, verificou-se que o EA também não apresentou toxicidade *in vitro* e foi capaz de reverter parcialmente a diminuição da viabilidade celular, induzida pela privação de glicose e oxigênio (PGO) e reperfusão. Agentes antioxidantes, como o DL-ditiotreitól (DTT), foram utilizados anteriormente em nosso laboratório, com resultados semelhantes, apresentando proteção parcial (Brongholi, et al., 2006). Rytter et al. (2005) em cultura de fatias organotípicas de hipocampo em protocolo de PGO, mostraram que o tratamento com antioxidantes não foi eficaz na prevenção da morte celular. Estes dados sugerem que a ação de radicais livres envolvidos no estresse oxidativo, durante a PGO, não sejam determinantes na morte celular, visto que antioxidantes potentes inibem parcialmente o processo de morte.

A fim de investigar se o potencial efeito neuroprotetor de EA seria mais eficaz em outros protocolos de neurotoxicidade, investigamos o efeito do EA contra a excitotoxicidade glutamatérgica. O glutamato diminui significativamente a viabilidade celular em fatias de hipocampo de ratos, mostrando um padrão de morte celular apoptótica, prevenida pelo MK-801 (Molz et al., 2008). Neste estudo EA também foi capaz de prevenir a morte celular induzida pelo glutamato, porém o uso de ambos bloqueou este efeito, mostrando a possibilidade de atuarem no mesmo receptor. Previamente, Boeck et al (2004) demonstrou o MK-801 bloqueando o efeito neuroprotetor do pré-condicionamento com NMDA contra os efeitos do AQ. Considerando que EA foi capaz de exercer efeito neuroprotetor *in vitro*, foi investigado se haveria efeito

neuroprotetor também administrando EA aos camundongos, e submetendo as fatias hipocâmpais à toxicidade do glutamato *ex vivo*. Desta forma, foram obtidos resultados positivos de prevenção da perda de viabilidade celular, corroborando o efeito neuroprotetor do EA.

Com o objetivo de investigar os possíveis mecanismos que participam do efeito neuroprotetor do EA, foi utilizado o AQ. Em trabalhos já publicados pelo nosso grupo (Tavares et al., 2000; 2002; 2008) o mecanismo de toxicidade de AQ via ativação do receptor NMDA, leva a uma desequilíbrio na retirada do glutamato da fenda sináptica causando um aumento dos efeitos excitotóxicos causados pelo sistema glutamatérgico que inclui um aumento de radicais livres, induzindo ao estresse oxidativo. Foi observado que EA foi capaz de prevenir a perda de viabilidade induzida pelo AQ, sugerindo, que o efeito protetor do EA estaria relacionado ao receptor NMDA. Além disso, nos estudos realizados também foi demonstrado que EA diminui a liberação e aumenta a captação de glutamato, diminuindo a concentração de glutamato extracelular.

Porém, EA não foi capaz de proteger os animais da incidência ou severidade de convulsões tônico-clônicas induzidas pelo AQ, mas EA foi capaz de prevenir danos celulares das convulsões. Realmente, a prevenção da perda de viabilidade, o equilíbrio entre captação e liberação de glutamato participa na redução da degeneração, observadas após as convulsões, mas este efeito de proteção celular não parece estar envolvido diretamente na proteção contra as convulsões, como previamente investigado em nosso laboratório (Boeck et al., 2004; Piermartiri et al., 2009). Segundo Tomé et al (2010), compostos antioxidantes podem exercer efeito neuroprotetor durante a fase aguda de convulsões diminuindo a severidade de lesões hipocâmpais, inibindo peroxidação de lipídios de membrana, que impede estágios iniciais de morte por apoptose. Neste estudo, EA apresentou substâncias conhecidas como antioxidantes e exerceu atividade antioxidante *in vitro* e diminuiu a peroxidação lipídica.

A modulação do receptor NMDA é um dos mecanismos mais investigados em relação às efetivas estratégias de neuroproteção (Stone, 2002). Considerando os resultados que obtivemos avaliando a toxicidade glutamatérgica *in vitro* e *in vivo* é possível sugerir que o EA exerça ação antagonista sobre o receptor NMDA, o que deverá ser avaliado por estudos de união a estes receptores. No entanto, deve-se

considerar que o bloqueio total da atividade dos receptores NMDA não é benéfico, pois reduz os seus efeitos tróficos.

Muitas vias de sinalização tem mostrado envolvimento em efeitos de agentes neuroprotetores contra a excitotoxicidade exercida pelo glutamato, especialmente a via PI3K/Akt (Tolosa et al. 2008; Herculano et al., 2010), que pode ser ativada por fatores neurotróficos, com implicações no crescimento, migração e sobrevivência celular. Neste estudo, o uso de LY204002, um inibidor da via PI3K, aboliu completamente o efeito protetor do EA. Além disto, em estudo *ex vivo*, verificou-se um aumento da fosforilação da Akt induzido pelo EA. É importante ressaltar que, a Akt ativada pela fosforilação através da PI3K, bloqueia a liberação de citocromo *c in vitro*, inibindo a ativação de caspase-3 e, também pode inibir outras proteínas pró-apoptóticas (Nakae et al., 2000), regulando assim o processo de apoptose. Portanto, os dados obtidos sugerem que EA pode estar exercendo seu efeito neuroprotetor através da modulação da via PI3K/Akt.

Adicionalmente, Wu e colaboradores (2010) mostraram que a via PI3K/Akt modula a expressão de GLT-1 reforçando os resultados obtidos nos estudos *in vitro*, *in vivo* e *ex vivo* que, quando analisadas em conjunto sugerem além da participação da via PI3K/Akt, a modulação do transporte de glutamato e, do receptor NMDA, como os mecanismos envolvidos no efeito neuroprotetor exercido pelo EA. Além disso, o EA possui em sua composição química como um dos polifenóis majoritários, o ácido ferúlico, caracterizado como antagonista competitivo do receptor NMDA (Yu et al., 2006).

Além do excesso de glutamato extracelular, a inflamação aparece como um elemento-chave no processo neurodegenerativo. Neurônios exibem sensibilidade a estímulos inflamatórios como o aumento a expressão da enzima iNOS e, estes estímulos levam a morte celular via danos oxidativos (Brown 2007). O NO portanto, tem um efeito significativo no SNC e a manipulação desta via constitui-se em novas possibilidades terapêuticas nas doenças neurodegenerativas em geral, inclusive na depressão (Kulkarni & Dhir, 2007; Ulak et al., 2008). Neste sentido, o aumento de iNOS induzido pelo glutamato foi totalmente bloqueado pela pré-administração do EA aos animais, mostra que o EA pode estar modulando a expressão de iNOS, contribuindo para a redução do dano oxidativo induzido pela alta produção de NO pela iNOS.

Os resultados discutidos até aqui se referem principalmente ao efeito neuroprotetor do EA frente a excitotoxicidade glutamatérgica. Existem evidências do envolvimento do excesso de glutamato e a morte neuronal na patofisiologia da depressão, sendo que, foi encontrado um aumento dos níveis de glutamato, no cérebro e no plasma e diminuição de volume hipocampal em pacientes com depressão. Além disso, antagonistas do receptor NMDA apresentam propriedades antidepressivas e antidepressivos convencionais reduzem a união, expressão e funcionamento do receptor NMDA (Sanacora et al., 2008). No presente estudo, portanto foi demonstrado que o EA apresenta um efeito tipo antidepressivo nos dois testes comportamentais utilizados, sem efeitos significativos na locomoção dos animais. Pesquisas recentes têm reforçado a indicação de que extratos de plantas incluindo, *Hypericum perforatum*, *Hypericum ensiense*, *Curcuma longa*, *Ginkgo biloba*, *Schinus molle*, *Rosmarinus officinalis* e *Aloysia polystachya*, exercem efeito tipo antidepressivo em animais (Wang et al., 2008; Machado et al., 2007, 2009; Hellióñ-Ibarrola, et al., 2008).

Neste estudo, o efeito tipo antidepressivo do extrato foi observado com uma dose menor de EA no teste de suspensão da cauda (TSC, 10 mg/kg), do que no teste do nado forçado (TNF, 100 mg/kg), resultado semelhante ao observado por Freitas e colaboradores (2010) com *Tabebuia avellanedae* e por Machado e colaboradores (2009) com *Rosmarinus officinalis*. Segundo Cryan et al. (2005) o TSC tem uma sensibilidade farmacológica maior, quando comparado ao TNF. O TNF não tem sido considerado um teste sensível para detecção de atividade de inibidores seletivos de recaptção de serotonina (ISRS), sendo esta atividade antidepressiva geralmente ativa no TSC (Borsini, 1995).

Outra diferença entre os dois testes utilizados se refere à curva dose-resposta, não sendo incomum obter-se uma curva bifásica no TNF (Machado et al., 2009; Freitas et al., 2010), enquanto que este evento é raro no TSC, no entanto, este evento foi observado por Butterweck et al (1997; 2003), utilizando extrato de *Hypericum perforatum*. Em relação à curva-bifásica observada neste estudo, descartou-se o efeito tóxico (pois uma leve toxicidade foi observada somente com 2000 mg/kg do EA, dose não utilizada nos estudos comportamentais), podendo-se inferir que altas concentrações de polifenóis podem atuar como pró-oxidantes (Hockenbery et. al., 1993; Cao et al. 1997), abolindo o efeito tipo antidepressivo do EA.

Quanto ao mecanismo de ação responsável pelo efeito tipo antidepressivo aqui demonstrado, o uso do NMDA foi capaz de reverter



o efeito do EA e foi observado também um efeito sinérgico entre EA e MK-801. Neste sentido, como o receptor NMDA induz a ativação de NOS, que converte L-arginina em NO e L-citrulina (Esplugues, 2002), sugere-se que a manipulação farmacológica da via NO poderia ser uma alternativa terapêutica ao tratamento da depressão (Ulak et al., 2008). De fato, estudos demonstram que, inibidores de NOS apresentam efeito tipo antidepressivo (Joca & Guimarães, 2006). Além disso, que, as concentrações intracelulares de cGMP são reguladas pela fosfodiesterase 5 (PDE5) e guanilato ciclase solúvel (sGC, Beavo, 1995).

Neste sentido, a indicação de que a via L-arginina-NO-cGMP está envolvida na redução de tempo de imobilidade exercido pelo EA é reforçada pelo fato de que nossos resultados evidenciaram que, o uso de L-arginina (substrato para NOS), foi capaz de inibir o efeito tipo antidepressivo causado pelo EA e foi observado um efeito sinérgico, do EA e um inibidor de NOS. Nossos resultados também demonstraram que o EA e inibidores da enzima guanilato ciclase solúvel (sGC) ou a enzima NOS, produziram efeito sinérgico sobre a atividade tipo antidepressiva no TSC. E a reversão do efeito tipo antidepressivo do EA por um inibidor seletivo da enzima PDE5, sugerem que EA pode estar exercendo seu efeito anti-imobilidade através da diminuição dos níveis de NO e cGMP.

Assim, o efeito tipo antidepressivo exercido por berberina, um alcalóide isolado de *Berberis aristata* (Kulkarni & Dhir, 2007), difenil-disselenito, uma substância antioxidante (Savegnano et al., 2007) ou ácido fólico (Brocardo et al., 2008) também foi evidenciado pelo uso de inibidores seletivos de atividade enzimática, sugerindo que a via L-arginina-NO-cGMP tem importante função na mediação dos efeitos comportamentais destas substâncias e também do EA, utilizado neste trabalho.

Quanto ao estudo dos mecanismos envolvidos no efeito tipo antidepressivo exercido pelo EA além da participação do sistema glutamatérgico, foi investigada também a participação dos sistemas, serotoninérgico, noradrenérgico e dopaminérgico. A hipótese monoaminérgica da depressão postula que o maior envolvido no processo neuroquímico da depressão é a diminuição da neurotransmissão monoaminérgica e o decréscimo simultâneo de noradrenalina e/ou serotonina (Schildkraut, 1965). Estudos pré-clínicos

e clínicos relataram um efeito-chave dos receptores 5-HT<sub>1</sub> e 5-HT<sub>2</sub> na patologia da depressão, bem como, na ação de diversos antidepressivos (Boothman et al., 2006). A maioria dos antidepressivos prescritos inibe a recaptação de serotonina ou noradrenalina e/ou ainda age como inibidor de monoamina oxidases (Taylor et al., 2005). Além disso, o sistema dopaminérgico também é um importante alvo implicado nas desordens envolvendo os transtornos de humor, pois segundo Klimek et al (2002) e Meyer et al (2002) existe um aumento da interação da dopamina com seus receptores e redução do transporte de dopamina em pacientes com depressão. Desta forma, a modulação dos três sistemas, serotoninérgico, noradrenérgico e dopaminérgico, têm mostrado participação nos efeitos comportamentais em testes animais preditivos de agentes antidepressivos como, o TNF e o TSC (Cryan et al., 2005; O'Leary et al., 2007).

Neste sentido, foram verificados os efeitos de antagonistas dos três sistemas, serotoninérgico, noradrenérgico e dopaminérgico sobre a ação anti-imobilidade do EA em camundongos. O pré-tratamento com os antagonistas de receptores, de serotonina 5-HT<sub>1A</sub> ou 5-HT<sub>2A/2C</sub>, de adrenoceptores- $\alpha_1$  ou  $\alpha_2$  e também, de dopamina D<sub>1</sub> ou D<sub>2</sub> reverteram o efeito anti-imobilidade do EA, sugerindo que existe a participação destes receptores no efeito tipo antidepressivo do EA no TSC. De acordo com Machado et al (2007, 2009) e Feitas et al (2010), a utilização de antagonistas destes mesmos receptores também reverteram o efeito anti-imobilidade exercido pelos extratos de, *Schinus molle* L., *Rosmarinus officinalis* L. e *Tabebuia avellanedae* L., respectivamente.

Medicamentos inibindo a recaptação de serotonina, noradrenalina e dopamina (inibidores triplos de recaptação) têm sido recentemente desenvolvidos, levando à uma ação mais rápida e eficiente do que os antidepressivos tradicionais (Chen & Skolnick, 2007). Publicações têm relatado o potencial de muitos extratos de plantas e seus constituintes como agentes antidepressivos com um mecanismo de ação que envolve uma interação simultânea dos sistemas monoaminérgicos (Zhang, 2004; Capra et al, 2010).

O ácido ferúlico (AF), componente majoritário do EA, além da atividade antioxidante apresenta propriedades antiinflamatórias, efeito benéfico em doenças que apresentam estresse e inflamação (Perluigi et al., 2006), modulação da apoptose (Jin et al., 2007), efeito antagônico competitivo ao receptor NMDA protegendo da excitotoxicidade glutamatérgica (Yu et al, 2006). Efeitos positivos do AF também foram

observados em um modelo de depressão induzida por estresse (Yabe et al., 2010). Desta forma, investigou-se a possibilidade do AF participar do efeito tipo antidepressivo exercido por EA. E neste estudo o AF exerceu efeito tipo antidepressivo em camundongos no TNF e no TSC.

Como o processo neuroquímico mais conhecido na depressão está relacionado à diminuição da neurotransmissão monoaminérgica (Schildkraut, 1965), a farmacoterapia convencional utiliza este sistema como alvo (Wong and Licinio, 2001). No efeito tipo antidepressivo do EA foi evidenciada a participação do sistema serotoninérgico. O mesmo ocorrendo no efeito tipo antidepressivo do AF e na sua administração combinada com antidepressivos ISRS.

Os animais foram pré-tratados com antagonistas dos receptores 5-HT<sub>1A</sub> ou 5-HT<sub>2A/2C</sub> indicando que ambos os sub-tipos de receptores de serotonina podem estar envolvidos no efeito tipo antidepressivo observado, a semelhança do EA. Realmente, compostos que bloqueiam estes receptores são eficientes como antidepressivos (Blier & Ward, 2003). Além disso, o AF foi capaz de produzir um efeito tipo antidepressivo sinérgico com alguns antidepressivos convencionais, fluoxetina, paroxetina e, sertralina no TSC. Estes resultados sugerem que uma combinação do AF com estes antidepressivos poderia ser uma potencial alternativa no tratamento da depressão.

Na busca por agentes terapêuticos para o tratamento da depressão, algumas vias de sinalização celular vem sendo documentadas, quanto ao seu envolvimento nas enfermidades neuropsiquiátricas. Neste estudo foram investigadas vias de sinalização envolvidas no efeito tipo antidepressivo do AF. Foi observado que o efeito tipo-antidepressivo do AF depende da ativação das vias da proteína cinase A (PKA), proteína cinase C (PKC), calmodulina Ca<sup>2+</sup>-dependente proteína cinase II (CaMKII), proteína cinase ativada por mitógeno/ proteína cinase regulada por sinal extracelular (MAPK/ERK) e PI3K.

A PKA está envolvida na síntese e liberação de neurotransmissores, expressão de genes, plasticidade sináptica, memória, crescimento, diferenciação e sobrevivência celular (Gould and Manji, 2002). O mecanismo mais conhecido da função de PKA, ERK e a via PI3K/Akt seria através da fosforilação de substratos, incluindo o CREB que ativa a expressão de proteínas como o BDNF. Estas

proteínas estão implicadas na sobrevivência e plasticidade neural (D'Sa and Duman, 2002), envolvidas na regulação da depressão e em tratamentos antidepressivos em modelos animais (Franco et al., 2008; Hashimoto, 2010). A ativação de CaMKII, segundo Du e colaboradores (2004) seria uma importante via na patofisiologia e tratamento de muitas doenças relacionadas ao estresse, pois as elevações de cálcio e AMPc induzem eventos necessários para plasticidade sináptica rápida (Pittenger and Duman, 2008). Estudos anteriores demonstraram que, o uso crônico de ferulato de sódio (AF hidrosolúvel) teve efeito neuroprotetor aumentando a fosforilação de ERK e Akt no hipocampo de ratos idosos (Jin et al., 2008) e contra o efeito da proteína beta-amilóide (Jin et al., 2005). Entretanto o exato mecanismo pelo qual AF modula as vias PKA, CaMKII, PKC, MAPK/ERK e PI3K, para produzir o efeito tipo antidepressivo não está esclarecido. Sabe-se que, o uso de antidepressivos que aumentam os níveis de serotonina ativam CREB através de diferentes vias de sinalização, como PKA, MAPK e CaMKII (D'Sa and Duman, 2002) e antagonistas do receptor NMDA tem demonstrado aumentar a liberação de serotonina no cérebro (Callado et al., 2000; Gaikwad et al., 2005; Tso et al., 2004), assim uma possibilidade para o mecanismo de ação seria que AF, como um antagonista do receptor NMDA (Yu et al., 2006), agiria bloqueando este receptor, afetando desta forma a neurotransmissão glutamatérgica e serotoninérgica.

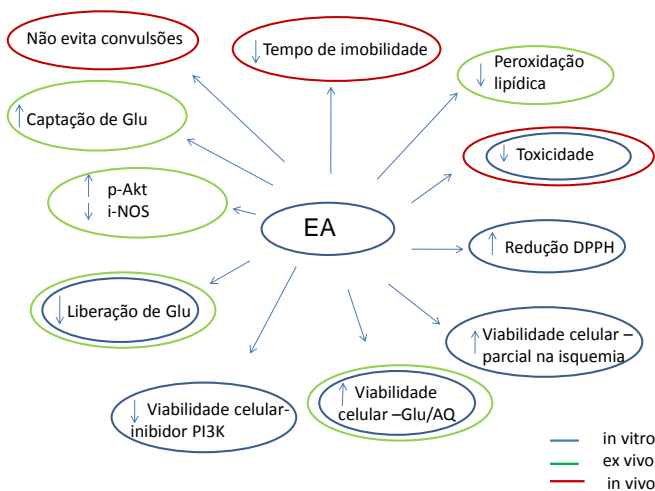
## 2.1. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em relação ao mecanismo de ação do EA na neuroproteção e no efeito tipo antidepressivo observados no conjunto de dados obtidos neste trabalho, seria possível que EA esteja exercendo seus efeitos benéficos através de, efeito antioxidante direto e/ou este efeito antioxidante pode estar modulando o transporte de glutamato. Ou ainda, EA poderia estar exercendo um efeito antagonico sobre os receptores NMDA, prevenindo a excitotoxicidade, o desequilíbrio no transporte de glutamato, o excesso de radicais livres e, a morte celular (Figura 2).

Segundo Uttara et al (2009) conforme a composição química podemos classificar um agente como tendo, efeito antioxidante direto, por via não enzimática (ação de carotenóides, polifenóis, compostos derivados do ebselen, tocoferóis e serotonina) e/ou também, efeito antioxidante indireto (ação de antagonistas de receptores como dopamina ou glutamato e inibidores de NOS) prevenindo

excitotoxicidade e excesso de radicais livres. Além disso, segundo Virgili & Marino (2008), a função das moléculas de origem vegetais ditos antioxidantes têm mostrado evidências de ser mais complexa do que se pensava (Figura 3). Vários mecanismos têm sido propostos para a ação destas substâncias envolvendo ou não atividade antioxidante como, modulação de receptores ou enzimas, regulação de sinalização celular e expressão de genes.

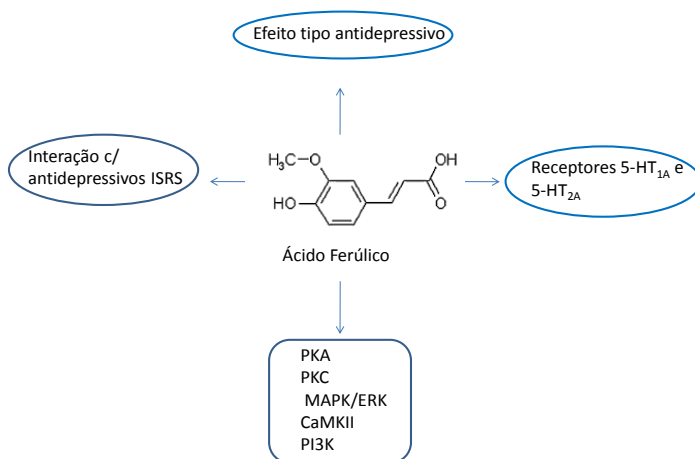
De acordo com os resultados obtidos neste trabalho, EA demonstrou ser um promissor agente terapêutico, em doenças neurológicas/neurodegenerativas envolvendo excitotoxicidade, parecendo que seu efeito pode ser devido à várias moléculas agindo em múltiplos alvos, como acontece por exemplo com, os extratos de, *Ginkgo biloba*, ou mais recentemente demonstrado com o de, *Camellia sinensis* (green tea) ou *Curcuma longa* (Figura 4).



**Figura 4. Efeitos biológicos do EA.** Resumo dos efeitos biológicos do EA revelados neste estudo, mostrando resultados obtidos em diferentes protocolos e modelos animais.

Por outro lado, a curcumina, extraída de *Curcuma longa*, tem sido estudada recentemente por suas atividades no tratamento de vários transtornos do SNC, com ação neuroprotetora na DA, discinesia,

depressão e epilepsia (Kulkarni & Dhir, 2010), um exemplo de uma molécula com ação em múltiplos alvos. Neste sentido, o AF utilizado neste trabalho também parece ser um bom candidato, tendo a princípio atribuídos a ele diversos efeitos como, antioxidante, antagonista de receptor NMDA, anti-inflamatório, antiapoptótico, tipo antidepressivo em modelo de estresse crônico e preventivo em doenças como DA e, segundo este estudo o AF também possui efeito tipo antidepressivo com envolvimento do sistema serotoninérgico no TSC, efeito sinérgico com antidepressivos SRSI e seu efeito tipo antidepressivo ativa vias de sinalização implicadas na patofisiologia dos transtornos de humor, bem como na depressão (Figura 5).



**Figura 5. Efeito tipo antidepressivo do AF.** Envolvimento do sistema serotoninérgico e vias de sinalização celular no efeito tipo antidepressivo de AF.

Segundo Youdim (2010), ambas as estratégias, extrato ou composto isolado, são favoráveis quando se trata de doenças neurodegenerativas com múltiplos alvos, como é o caso de, DA, Mal de Parkinson ou depressão, que possuem etiologias bastante complexas, incluindo cascatas de eventos neurotóxicos moleculares que resultam em morte neuronal.

### 3 CONCLUSÕES

O extrato aquoso de *Aloysia gratissima* (EA) apresentou compostos químicos de natureza polifenólica e carotenóidica, com conhecida atividade biológica como antioxidante;

O efeito antioxidante de EA foi evidenciado *per se* e pela diminuição da peroxidação lipídica;

EA não mostrou efeitos tóxicos em camundongos até a dose de 1000 mg/kg ou em fatias de hipocampo;

A neuroproteção promovida por EA frente ao dano celular induzido por glutamato ou ácido quinolínico em fatias de hipocampo de ratos envolve diminuição da liberação de glutamato e ativação da via da PI3K;

No protocolo de PGO entretanto, a proteção na isquemia foi considerada parcial;

O EA não preveniu o surgimento das convulsões induzidas pelo ácido quinolínico, porém apresentou efeito neuroprotetor contra os efeitos de um agonista do receptor NMDA, prevenindo a perda de viabilidade e modulando o transporte de glutamato nas fatias hipocampais destes animais;

O efeito do tipo antidepressivo do EA (10 mg/kg) observado em testes preditivos de agentes antidepressivos envolve a participação dos receptores NMDA e a via L-arginina/NO-cGMP, além disso, EA na mesma concentração, foi capaz de proteger fatias de hipocampo de camundongos envolvendo o aumento da fosforilação de Akt e a redução da expressão de iNOS;

O sistema monoaminérgico através dos receptores serotoninérgicos, noradrenérgicos e dopaminérgicos participa do efeito tipo antidepressivo de EA;

A utilização do composto fenólico majoritário do EA, o ácido ferúlico (AF), mostrou que este exerce efeito tipo antidepressivo, sendo

o mecanismo de ação relacionado ao sistema serotoninérgico à semelhança do EA;

Foi possível mostrar que o efeito tipo antidepressivo do AF envolve a participação de enzimas de vias de sinalização celular implicadas na sobrevivência celular e plasticidade sináptica, PKA, PKC, CaMKII, MAPK/ERK e PI3K.

#### **4 PERSPECTIVAS**

Pesquisar a presença de outras classes de metabólitos no EA;

Determinar a concentração dos componentes do extrato no sangue e cérebro;

Realizar teste de toxicidade crônica com o EA;

Realizar ensaio de união de glutamato a seus receptores de membrana e avaliar o efeito do EA e AF;

Investigar parâmetros de morte necrótica e apoptótica no efeito neuroprotetor de EA;

Investigar de forma mais detalhada o efeito antioxidante de EA,

Analizar ensaio imunohistoquímico quanto a expressão de iNOS e os transportadores de glutamato gliais, GLAST e GLT-1, em animais tratados com ácido quinolínico;

Avaliar o conteúdo de BDNF e ativação de CREB;

Avaliar os efeitos neuroprotetor e tipo antidepressivo no uso crônico de EA;

Aprofundar a investigação dos mecanismos e vias de sinalização no efeito tipo antidepressivo do ácido ferúlico.



#### 4. REFERÊNCIAS

ABREU, I.N., MAZZAFERA, P. Effect of water and temperature stress on the content of active constituents of *Hypericum brasiliense* Choisy. *Pl Physiol Biochem* 43: 241–248, 2005.

ADAMS, M., GMÜNDER, F., HAMBURGER, M. Plants traditionally used in age related brain disorders - A survey of ethnobotanical literature. *J Ethnopharmacol* 113: 363-381, 2007.

ALBUQUERQUE, U.P., HANAZAKI, N. As pesquisas etnorientadas na descoberta de novas drogas de interesse médico e farmacêutico: Fragilidade e perspectivas. *Rev Brasil Farmacogn* 16: 678-689, 2006.

AMANTEA, D., FRATTO, V., MAIDA, S., ROTIROTI D., RAGUSA, S., NAPPI, G., BAGETTA, G., CORASANITI, M.T. Prevention of glutamate accumulation and upregulation of phospho-Akt may account for neuroprotection afforded by bergamot essential oil against brain injury induced by focal cerebral ischemia in rat. *Int Rev Neurobiol* 85: 389–405, 2009.

AN, L. ZHANG, Y.Z., YU, N.J., LIU, X.M., ZHAO, N., YUAN, L. Role for serotonin in the antidepressant-like effect of a flavonoid extract of Xiaobuxin-Tang. *Pharmacol Biochem Behav* 89: 572–80, 2008.

ANDERSON, M.; BERGENDORF, O.; NIELSEN, M.; STERNER, O.; WITT, R.; AL, J.; LU, A.; WANG, A. M. Inhibition of kainic acid binding to glutamate receptors by extracts of *Gastrodia*. *Phytochemistry* 38: 835-836, 1995.

ANDERSON, C.M., SWANSON, R.A. Astrocyte glutamate transport: review of properties, regulation and physiological function. *Glia* 32: 1-14, 2000.

ARIAS TOLEDO B. Diversidad de usos, prácticas de recolección y diferencias según género y edad en el uso de plantas medicinales en Córdoba, Argentina. *BLACPMA* 8: 389 – 401, 2009.

BARNES, G.N., SLEVIN, J.T. Ionotropic glutamate receptor biology: effect on synaptic connectivity and function in neurological disease. *Curr Med Chem* 10: 2059–2072, 2003.

BAYIR, H., FADEEL, B., PALLADINI, M.J., WITASP, E., KURNIKOV, I.V., TYURINA, Y.Y., TYURIN, V.A., AMOSCATO, A.A., JIANG, J., KOCHANNEK, P.M., DEKOSKY, S.T., GREENBERGER, J.S., SHVEDOVA, A.A., KAGAN, V.E. Apoptotic interactions of cytochrome *c*: Redox flirting with anionic phospholipids within and outside of mitochondria. *Biochem Biophys Acta (BBA) - Bioenergetics* 1757: 648–659, 2006.

BEAVO, J.A. Cyclic nucleotide phosphodiesterases: functional implications of multiple isoforms. *Physiol Rev* 75: 725–748, 1995.

BERTON, O., NESTLER E.J. New approaches to antidepressant drug discovery: beyond monoamines. *Nat Rev Neurosci* 7: 137–151, 2006.

BLIER, P., WARD, N.M. Is there a role for 5-HT<sub>1A</sub> agonists in the treatment of depression? *Biol Psychiatry* 53: 193–203, 2003.

BLOCK, M.L., ZECCA, L., HONG, J.S. Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms. *Nat Rev Neurosci* 8: 57–69, 2007.

BOECK, C.R., GANZELLA, M., LOTTERMANN, A., VENDITE, D. NMDA preconditioning protects against seizures and hippocampal neurotoxicity induced by quinolinic acid in mice. *Epilepsia* 45: 745–750, 2004.

BOLDI, A.M. Libraries from natural product-like scaffolds. *Curr Opin Chem Biol* 8: 281–286, 2004.

BOOTHMAN, L.J., MITCHELL, S.N., SHARP, T. Investigation of the SSRI augmentation properties of 5-HT<sub>2</sub> receptor antagonists using *in vivo* microdialysis. *Neuropharmacol* 50: 726–732, 2006.

BORSINI, F. Role of the serotonergic system in the forced swimming test. *Neurosci Biobehav Rev* 19: 377–395, 1995.

BROCARD, P.S., BUDNI, J., KASTER, M.P., SANTOS, A.R.S., RODRIGUES, A.L.S. Folic acid administration produces an antidepressant-like effect in mice: evidence for the involvement of the serotonergic and noradrenergic systems. *Neuropharmacol* 54: 464–73, 2008.

BROWN, G.C. Mechanisms of inflammatory neurodegeneration: iNOS and NADPH oxidase. *Biochem Soc Transact* 35: 1119–1121, 2007.

BROWN, G.C., BAL-PRICE, A. Inflammatory neurodegeneration mediated by nitric oxide, glutamate, and mitochondria. *Mol Neurobiol* 27: 325–355, 2003.

BRONGHOLI K., SOUZA D.G., BAINY A.C., DAFRÉ A.L., TASCA C.I. Oxygen-glucose deprivation decreases glutathione levels and glutamate uptake in rat hippocampal slices. *Brain Res* 1083: 211-8, 2006.

BRUCE, A., NAJM, I., MALFROY, B., BAUDRY, M. Effects of desferrioxamine/manganese complex, a superoxide dismutase-mimic, on kainate-induced pathology in rat brain. *Neuroscience* 13: 265–271, 1992.

BRUNET A., DATTA S.R., GREENBERG M.E. Transcription-dependent and -independent control of neuronal survival by the PI3K-Akt signaling pathway. *Curr Opin Neurobiol* 11: 297–305, 2001.

BURKART, A. Colección Científica del I.N.T.A. Flora Ilustrada de Entreríos (V), 1<sup>st</sup> ed, Buenos Aires, Argentina, 1979.

BUTTERWECK, V., WALL, A., LIEFLANDER-WULF, U., WINTERHOFF, H., NAHRSTEDT, A. Effects of the total extract and fractions of *Hypericum perforatum* in animal assays for antidepressant activity. *Pharmacopsychiatry* 30: 117–124, 1997.

BUTTERWECK, V., CHRISTOFFEL, V., NAHRSTEDT, A., PETEREIT, F., SPENGLER, B., WINTERHOFF, H. Step by step removal of hyperforin and hypericin: activity profile of different *Hypericum* preparations in behavioral models. *Life Sci* 73: 627–639, 2003.

CALIXTO, JB. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America. A personal view. *J Ethnopharmacol* 100: 131–134, 2005.

CALLADO, L.F., HOPWOOD, S.E., HANCOCK, P.J., STAMFORD, J.A. Effects of dizocilpine (MK 801) on noradrenaline, serotonin and dopamine release and uptake. *NeuroReport* 11: 173-176, 2000.

CAMACHO, A., MASSIEU, L. Role of glutamate transporters in the clearance and release of glutamate during ischemia and its relation to neuronal death. *Arch Med Res* 37:11–18, 2006.

CAO, G., SOFIC, E., PRIOR, R.L. Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships. *Free Radic Biol Med* 22: 749-760, 1997.

CAPRA, J.C., CUNHA, M.P., MACHADO, D.G., ZOMKOWSKI, A.D.E., MENDES, B.G., SANTOS, A.D.R., PIZZOLATTI, M.G., RODRIGUES, A.L.S. Antidepressant-like effect of scopoletin, a coumarin isolated from *Polygala sabulosa* (Polygalaceae) in mice: Evidence for the involvement of mono-aminergic systems. *Eur J Pharmacol* 643: 232-238, 2010.

CÁRDENAS A., MORO MA, HURTADO O, LEZA JC, LORENZO P, CASTRILLO A, BODELÓN OG, BOSCA L, LIZASOAIN, I. Implication of glutamate in the expression of inducible nitric oxide synthase after oxygen and glucose deprivation in rat forebrain slices. *J Neurochem* 74: 2041–2048, 2000.

CASTRO, L.O., CHEMALE, V.M. Plantas medicinais, condimentares e aromáticas: descrição e cultivo. Guaíba, Agropecuária, 1995.

CHEN Z, SKOLNICK P. Triple uptake inhibitors: therapeutic potential in depression and beyond. *Expert Opin Investig Drugs* 16:1365–1377, 2007.

CHENG J, DAÍ F, ZHOU B, YANG L, LIU Z. Antioxidant activity of hydroxycinnamic acid derivatives in human low density lipoprotein: Mechanism and structure–activity relationship *Food Chem* 104: 132–139, 2007.

CLARDY, J., WALSH, C. Lessons from natural molecules. *Nature* 432: 729–837, 2004.

CRYAN, J.F., VALENTINO, R.J., LUCKI, I. Assessing substrates underlying the behavioral effects of antidepressants using the modified rat forced swimming test. *Neurosci Biobehav Rev* 29: 547–69, 2005.

CHEN, H.S., LIPTON, S.A. The chemical biology of clinically tolerated NMDA receptor antagonists. *J Neurochem* 97: 1611–1626, 2006.

DADÉ MM, FIORAVANTI DE, SCHINELLA GR, TOURNIER HA. Total antioxidant capacity and polyphenol content of 21 aqueous extracts obtained from native plants of Traslasierra valley (Argentina). *BLACPMA* 8: 529 – 539, 2009.

DANBOLT, N.C. Glutamate uptake. *Prog Neurobiol* 65: 1-105, 2001.

DAWSON V, BRAHMBHATT HP, MONG JA, DAWSON TM. Expression of inducible nitric oxide synthase causes delayed neurotoxicity in primary mixed neuronal-glia cortical cultures. *Neuropharmacol* 33: 1425-1430, 1994.

DELLACASA A.D., BAILLAC P.N., PONZI M.I. In vitro activity of essential oils from San Luis-Argentina against *Ascosphaera apis*. *J Essent Oil Res* 15: 282-285, 2003.

DEL VITTO, L.A., PETENATTI, E.M., PETENATTI, M.E. Recursos Herbolarios de San Luis (República Argentina). Primeira parte: Plantas Nativas. *Multequina* 6, 49-66, 1997.

D'SA, C., DUMAN, R.S. Antidepressants and neuroplasticity. *Bipolar Disord* 4: 183-194, 2002.

DU, J., SZABO, S.T., GRAY, N.A., MANJI, H.K. Focus on CaMKII: a molecular switch in the pathophysiology and treatment of mood and anxiety disorders. *Int J Neuropsychopharmacol* 7 243–248, 2004.

DUSCHATZKY, C.B., MARTINEZ, A.N., ALMEIDA, N.V., BONIVARDO, S.L. Nematicidal activity of the essential oils of several Argentina plants against the root-knot nematode. *J Essential Oil Res* 16: 626-628, 2004.

DURING, M.J., SPENCER, D.D. Extracellular hippocampal glutamate and spontaneous seizure in the conscious human brain. *Lancet* 341: 1607–1610, 1993.

ELIZABETSKY, E. Etnofarmacologia Como Ferramenta de Busca de Substâncias Ativas. In: *Farmacognosia: Da planta ao medicamento*, Simões C.M.O. et al. (Eds), UFRGS/UFSC, Porto Alegre/Florianópolis, 2000, pp. 87–100.

ELVIN-LEWIS, M. Should we be concerned about herbal remedies? *J Ethnopharmacol* 75: 141-164, 2001.

ESPLUGUES, J.V. NO as a signalling molecule in the nervous system. *Brit J Pharmacol* 135: 1079–1095, 2002.

FLOYD, R.A. Neuroinflammatory process are important in neurodegenerative diseases: a hypothesis to explain the increased formation of reactive oxygen and nitrogen species as major factors involved in neurodegenerative disease development. *Free Radical Biol Med* 26: 1346–1355, 1999.

FRANCO, J.L., POSSER, T., BROCARDO, P.S., TREVISAN, R., ULIANO-SILVA, M., GABILAN, N.H., SANTOS, A.R.S., LEAL, R.B., RODRIGUES, A.L.S., FARINA, M., DAFRE, A.L. Involvement of glutathione, ERK1/2 phosphorylation and BDNF expression in the antidepressant-like effect of zinc in rats. *Behav Brain Res* 188: 316–323, 2008.

FREITAS, A.E., BUDNI, J., LOBATO, K.R., BINFARÉ, R.W., MACHADO, D.G., JACINTO, J., VERONEZI, P.O., PIZZOLATTI, M.G., RODRIGUES, A.L.S. 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: 335–343, 2010.

GANZELLA, M., JARDIM, F.M., BOECK, C.R., VENDITE, D. Time course of oxidative events in the hippocampus following intracerebroventricular infusion of quinolinic acid in mice. *Neurosci Res* 55: 397-402, 2006.

GARCÍA, C.C., TALARICO, L., ALMEIDA, N., COLOMBRES, S., DUSCHATZKY, C., DAMONTE, E.B. Virucidal activity of essential oils from aromatic plants of San Luis, Argentina. *Phytot Res* 17:1073-1075, 2003.

GAIKWAD, R.V., GAONKAR, R.K., JADHAV, S.A., THORAT, V.M., JADHAV, J.H., BALSARA, J.J. Involvement of central serotonergic systems in dextromethorphan-induced behavioural syndrome in rats. *Indian J Exp Biol* 43: 620-625, 2005.

GOMES, N.G., CAMPOS, M.G., ORFÃO, J.M., RIBEIRO, C.A. Plants with neurobiological activity as potential targets for drug Discovery. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 33: 1372–1389, 2009.

GOULD T.D., MANJI H.K. Signaling networks in the pathophysiology and treatment of mood disorders. *J Psychosomat Res* 53: 687–697, 2002.

GRAF, E. Antioxidant potential of ferulic acid. *Free Radic Biol Med* 13: 435- 448, 1992.

Guillet, B.A., Velly, L.J., Canolle, B., Mamejean, F.M., Nieoullon, A.L., Pisano, P. Differential regulation by protein kinases of activity and cell surface expression of glutamate transporters in neuron-enriched cultures. *Neurochem Int* 46: 337-346, 2005.

HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J.M.C. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 3.ed. New York: Oxford, University, 1999, 936 p.

HARDINGHAM, G.E. Pro-survival signalling from the NMDA receptor. *Biochem Soc Trans* 34: 936–938, 2006.

HASHIMOTO, K. Brain-derived neurotrophic factor as a biomarker for mood disorders: An historical overview and future directions. *Psychiatry Clin Neurosci* 341–357, 2010.

HERCULANO, B.A., VANDRESEN-FILHO, S., MARTINS, W.C., BOECK, C.R., TASCA, C.I. NMDA preconditioning protects against quinolinic acid-induced seizures via PKA, PI3K and MAPK/ERK signaling pathways. *Behav Brain Res* 219: 92-97, 2011.

HEYES, M.P., WYLER, A.R., DEVINSKY, O., YERGEY, J.A., MARKEY, S.P., NADI, N.S. Quinolinic acid concentrations in brain and cerebrospinal fluid of patients with intractable complex partial seizures. *Epilepsia* 31: 172-177, 1990.

HELLIÓN-IBARROLA, M.C., IBARROLA, D.A., MONTALBETTI, Y., KENNEDY, M.L., HEINICHEN, O., CAMPUZANO, M., FERRO, E.A., ALVARENGA, N., T., TORTORIELLO, J., DE LIMA, T.C.M., MORA, S. The antidepressant-like effects of *Aloysia polystachia* (Griseb.) Moldenke (Verbenaceae) in mice. *J Ethnopharmacol* 105: 400-408, 2008.

HEWETT, S.J., CSERNANSKY, C.A., CHOI, D.W. Selective potentiation of NMDA-induced neuronal injury following induction of astrocytic iNOS. *Neuron* 13:487-494, 1994.

HOCKENBERY, D.M., OLTVAI, Z.N., YIN, X.M., MILLIMAN, C. L., KORSMEYER, S.J. Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. *Cell* 75: 241-251, 1993.

IZQUIERDO, I., MEDINA, J.H. Memory formation: the sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures. *Neurobiol Learn Mem* 68: 285–316, 1997.

JFCRF, The Japan Food Chemical Research Foundation. 1996. Existing list of items list additives – The 56th Issue of Japanese’s Life and Health Ministry Director General Notification “health food additives based on the law and displayed”. Disponível em: <<http://www.ffcr.or.jp/>> Acesso em: 29 mar. 2011.

JIN, Y., YAN, E.Z., FAN, Y., ZONG, Z.H., QI, Z.M., LI, Z. Sodium ferulate prevents amyloid-beta-induced neurotoxicity through suppression of p38 MAPK and upregulation of ERK-1/2 and Akt/protein kinase B in rat hippocampus. *Acta Pharmacol Sin* 26: 943-951, 2005.

JIN, Y., YAN, E., FAN, Y., GUO, X., ZHAO, Y., ZONG, Z., LIU, Z. Neuroprotection by sodium ferulate against glutamate-induced apoptosis is mediated by ERK and PI3 kinase pathways. *Acta Pharmacol Sin* 28: 1881–1890, 2007.



JIN Y, YAN E, LI X, FAN Y, ZHAO Y, LIU Z, LIU W. Neuroprotective effect of sodium ferulate and signal transduction mechanisms in the aged rat hippocampus *Acta Pharmacol Sin* 29: 1399–1408, 2008.

JOCA, S.R.L., GUIMARÃES, F.S. Inhibition of neuronal nitric oxide synthase in the rat hippocampus induces antidepressant-like effects. *Psychopharmacol (Berl.)*, 185: 298-305, 2006.

KAGAN, V.E., FABISIAK, J.P., SHVEDOVA, A.A., TYURINA, Y.Y., TYURIN, V.A., SCHOR, N.F., KAWAI, K. Oxidative signaling pathway for externalization of plasma membrane phosphatidylserine during apoptosis. *FEBS Lett* 477:1-7, 2000.

KATSUBE, T., TABATA, H., OHTA, Y., YAMASAKI, Y., ANUURAD, E., SHIWAKU, K.; YAMANE, Y. Screening for antioxidant activity in edible plant products: comparison of low-density lipoprotein oxidation assay, DPPH radical scavenging assay, and Folin-Ciocalteu assay. *J Agric Food Chem* 52: 2391-2396, 2004.

KERR, J.F.R., WYLLIE, A.H., CURRIE, A.R. Apoptosis. A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26: 18, 1972.

KIM, Y.; PARK, E. J.; KIM, J.; KIM, Y.; KIM, S. R.; KIM, Y. C. Neuroprotective constituents from *Hedyotis diffusa*. *J. Nat. Prod.* 64: 75-78, 2001.

KLIMEK, V., SCHENCK, J.E., HAN, H., STOCKMEIER, C.A., ORDWAY, G.A. Dopaminergic abnormalities in amygdaloid nuclei in major depression: a postmortem study. *Biol Psychiatry* 52:740–748, 2002.

KOEHN, F.E., CARTER, G.T. The evolving role of natural products in drug discovery. *Nature Rev Drug Discov* 4, 206–220, 2005.

KOLLA, N., WEI, Z, RICHARDSON, J.S., LI, X. Amitriptyline and fluoxetine protect PC12 cells from cell death induced by hydrogen peroxide. *J Psychiatry Neurosci* 30: 196–201, 2005.

KULKARNI, S.K., DHIR, A. Possible involvement of L-arginine-nitric oxide (NO)-cyclic guanosine monophosphate (cGMP) signaling pathway in the antidepressant activity of berberine chloride. *Eur J Pharmacol* 569:77-83, 2007.

KULKARNI, S.K., DHIR, A. An overview of curcumin in neurological disorders. *Indian J Pharm Sci* 72: 149-154, 2010.

LAASONEN-BALK, T., KUIKKA, J., VIINAMAKI H., HUSSO-SAASTAMOINEN, M., LEHTONEN, J., TIIHONEN, J. Striatal dopamine transporter density in major depression. *Psychopharmacol* 144: 282-285, 1999.

LAPA, A.J., SOUCCAR, C., LIMA-LANDMAN, M.T.R., GODINHO, R.O., DE LIMA, T.C.M. Farmacologia e toxicologia de produtos naturais. In: Simões, C.M.O.; Schenkel, E.P.; Gosmann, G.; Mello, J.C.P.de; Mentz, L.A.; Petrovick, P.R. (Org.). *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 3.ed. Porto Alegre/Florianópolis, UFRGS/EDUFSC, 2001. p.183-198.

LEE, A.L., OGLE, W.O., SAPOLSKY, R.M. Stress and depression: possible links to neuron death in the hippocampus. *Bip Disord* 4: 117–128, 2002.

LIU, H., QIU, N., DING, H., YAO, R. Polyphenols contents and antioxidant capacity of 68 Chinese herbals suitable for medical or food uses. *Food Res Int* 41: 363-370, 2008.

MACHADO, D.G., KASTER, M.P., BINFARÉ, R.W., DIAS, M., SANTOS, A.R.S., PIZZOLATTI, M.G., BRIGHENTE, I.M.C., RODRIGUES, A.L.S. 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.

MACHADO, D.G., BETTIO, L.E.B., CUNHA, M.P., CAPRA, J.C., DALMARCO, J.B., PIZZOLATTI, M.G., RODRIGUES, A.L.S. Antidepressant-like effect of the extract of *Rosmarinus officinalis* in mice: Involvement of the monoaminergic system. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 33: 642–650, 2009.

MATTSON, M.P. Glutamate and neurotrophic factors in neuronal plasticity and disease. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1144: 97–112, 2008.

MATUTE, C., ALBERDI, E., DOMERCQ, M., SÁNCHEZ-GÓMEZ, M., PÉREZ-SAMARTÍN, A., RODRÍGUEZ-ANTIGÜEDAD, A., PÉREZ-CERDÁ, F. Excitotoxic damage to white matter. *J Anatomy* 210: 641-778, 2007.

MAURI, M.C., FERRARA, A., BOSCATI, L., BRAVIN, S., ZAMBERLAN, F., ALECCI, M., INVERNIZZI, G. Plasma and platelet amino acid concentrations in patients affected by major depression and under fluvoxamine treatment. *Neuropsychobiol* 37: 124–129, 1998.

MEYER, H.C.J., KRÜGER, S., WILSON, A.A., CHRISTENSEN, B.K., GOULDING, V.S., SCHAFFER, A., MINIFIE, C., HOULE, S., HUSSEY, D., KENNEDY, S.H. Lower dopamine transporter binding potential in striatum during depression. *NeuroReport* 12: 4121–4125, 2001.

MICHIELS, C., RAES, M., TOUSSAINT, O., REMACLE, J. Importance of Se-glutathione peroxidase, catalase, and Cu/Zn-SOD for cell survival against oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 17: 235–248, 1994.

MOLZ, S., DECKER, H., DAL-CIM, T., CREMONEZ, C., CORDOVA, F.M., LEAL, R.B., TASCA, C.I. Glutamate-induced toxicity in hippocampal slices involves apoptotic features and p38 MAPK signaling. *Neurochem Res* 33: 27-36, 2008.

MORA, S., DÍAZ-VÉLIZ, G., MILLÁN, R., LUNGENSTRASS, H., QUIRÓS, S., COTO-MORALES, T., HELLIÓN IBARROLA, M.C. Anxiolytic and antidepressant-like effects of the hydroalcoholic extract from *Aloysia polystachya* in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 82:373-378, 2005.

MORAES-DE-SOUZA, R. A.; OLDONI, T. L. C.; REGITANO-D'ARCE, M. A. B.; ALENCAR, S. M. Actividad antioxidante y

compuestos fenólicos en infusiones herbarias consumidas en Brasil. *Cienc Tecnol Aliment* 6: 41-47, 2008.

MORO, M.A., CÁRDENAS, A., HURTADO, O., LEZA, J. C., LIZASOAIN, I. Role of nitric oxide after brain ischaemia. *Cell Calcium* 36: 265-275, 2004.

MULLER, W. E., SINGER A., WONNEMANN, M. Mechanism of action of St. Johns wort extract. *Schweiz Rundsch Med Prax* 89: 2111-2121, 2000.

MURPHY, S. Production of nitric oxide by glial cells: Regulation and potential roles in the CNS. *Glia* 29: 1-13, 2000.

MURRAY, M.I., HALPERN, M.T., LEPPIK, I.E. Cost of refractory epilepsy in adults in the USA. *Epilepsy Res* 23: 139-148, 1996.

NAKAE, J., BARR, V., ACCILI, D. Differential regulation of gene expression by insulin and IGF-1 receptors correlates with phosphorylation of a single amino acid residue in the forkhead transcription factor FKHR, *EMBO J.* 19: 989-996, 2000.

NEWMAN, D.J., CRAGG, G.M., SNADER, K.M. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. *J Nat Prod* 66: 1022-1037, 2003.

NISHIMOTO, T., HIHARA, T., AKAIKE, A., NIIDOME, T., SUGIMOTO, H.  $\alpha$ -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionate attenuates glutamate-induced caspase-3 cleavage via regulation of glycogen synthase kinase 3 $\beta$ . *J Neurosci Res* 86: 1096-1105, 2008.

O'LEARY, O.F., BECHTHOLT, A.J., CROWLEY, J.J., HILL, T.E., 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. *Psychopharmacol* 192: 357-371, 2007.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS) Traditional Medicine Strategy 2002-2005. Geneva,WHO/EDM/TRM/2002.1, 2002.

PAULOSE, C.S., CHATHU, F., KHAN, S.R., KRISHNAKUMAR, A. Neuroprotective role of *Bacopa monnieri* extract in epilepsy and effect of glucose supplementation during hypoxia: glutamate receptor gene expression. *Neurochem Res* 33: 1663-1671, 2008.

PENG, C., CHIOU, S., CHEN, S., CHOU, Y., KU, H., CHENG, C., YEN, C., TSAI, T., CHANG, Y., KAO, C. Neuroprotection by Imipramine against lipopolysaccharide-induced apoptosis in hippocampus-derived neural stem cells mediated by activation of BDNF and the MAPK pathway. *Eur Neuropsychopharmacol* 18: 128-140, 2008.

PERLUIGI, M., JOSHI, G., SULTANA, R., CALABRESE, V., DE MARCO, C., COCCIA, R., CINI, C., BUTTERFIELD, A. *In vivo* protective effects of ferulic acid ethyl ester against amyloid-beta peptide 1-42-induced oxidative stress. *J Neurosci Res* 84: 418-426, 2006.

PIERMARTIRI, T.C.B., VANDRESEN-FILHO, S., HERCULANO, B.A., MARTINS, W.C., DAL'AGNOLO, D., STROEH, E., CARQUEJA, C.L., BOECK, C.R., TASCA, C.I. Atorvastatin prevents hippocampal cell death due to quinolinic acid-induced seizures in mice by increasing Akt phosphorylation and glutamate uptake. *Neurotox Res* 16: 106-115, 2009.

PITTENGER, C., DUMAN, R.S. Stress, depression, and neuroplasticity: a convergence of mechanisms. *Neuropsychopharmacol* 33: 88-109, 2008.

PORTAL DA SAÚDE 2010 Disponível em:  
<<http://www.bu.ufsc.br/design/framesrefer.php>>.  
<[http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar\\_texto.cfm?idtxt=30277&janela=1](http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar_texto.cfm?idtxt=30277&janela=1)> Acesso em: 19 fev. 2011.

RAVEN, P.H., EVERT, R.F., EICHHORN, S.E. *Biologia vegetal*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A. 6 ed, 2001. 906 p.

REZNICHENKO, L., AMIT, T., YODIM, M.B., MANDEL, S. Green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate induces neurorescue of long-term serum-deprived PC12 cells and promotes neurite outgrowth. *J Neurochem* 93: 1157-1167, 2005.

RICCIARDI, G.A.L., VAN BAREN, C.M., DI LEO LIRA, P., RICCIARDI, A.I.A., LORENZO, D., DELLACASSA, E., BANDONI, A. L. Volatile constituents from aerial parts of *Aloysia gratissima* (Gillies & Hook.) Tronc. var. *gratissima* growing in Corrientes, Argentina. *Flavour Fragr J* 21: 698–703, 2006.

RICHARDSON, J.S. Animal models of depression reflect changing views on the essence and etiology of depressive disorders in humans. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 15: 199–204, 1991.

ROSAS-ROMERO, A., SAAVEDRA, G. Screening Bolivian plants for antioxidant activity. *Pharm Biol* 43: 79-86, 2005.

ROSSI, D.J., OSHIMA, T., ATTWELL, D. Glutamate release in severe brain ischaemia is mainly by reversed uptake. *Nature* 403: 316-321, 2000.

RYTTER, A., CARDOSO, C.M., JOHANSSON, P., CRONBERG, T., HANSSON, M.J., MATTIASSON, G., ELMER, E., WIELOCH, T. The temperature dependence and involvement of mitochondria permeability transition and caspase activation in damage to organotypic hippocampal slices following *in vitro* ischemia. *J Neurochem* 95: 1108–1117, 2005.

SAMDANI AF, DAWSON TM, DAWSON, VL. Nitric oxide synthase in models of focal ischemia. *Stroke* 28:1283-1288, 1997.

SANACORA, G., ZARATE, JR C.A., KRYSTAL, J., MANJI, H.K. Targeting the glutamatergic system to develop novel, improved therapeutics for mood disorders. *Nat Rev Drug Discov* 7: 426-437, 2008.

SAVEGNAGO, L., JESSE, C.R., PINTO, L.G., ROCHA, J.B.T., BARANCELLI, D.A., NOGUEIRA, C.W., ZENI, G. Diphenyl diselenide exerts antidepressant-like and anxiolytic-like effects in mice: Involvement of L-arginine-nitric oxide-soluble guanylate cyclase pathway in its antidepressant-like action. *Pharmacol Biochem Behav* 88: 418–426, 2008.

SCHENKEL, E.P., ZANNIN, M., MENTZ L.A., BORDIGNON, S.A.L., IRGANG, B. 2001. Plantas tóxicas. In: Simões, C.M.O., Schenkel, E.P., Gosmann, G., Mello, J.C.P., Mentz, L.A., Petrovick,

P.R. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 3.ed. Porto Alegre/Florianópolis, UFRGS/EDUFSC, 2001, p.755-788.

SCHILDKRAUT, J.J. The catecholamine hypothesis of affective disorders: a review of supporting evidence. *Am J Psychiatry* 122: 509–522, 1965.

SCHMIDT, A.P., LARA, D.R., MARAHIN, J.F., PERLA, A.S., SOUZA, D.O. Guanosine and GMP prevent seizures induced by quinolinic acid in mice. *Brain Res* 864: 40-43, 2000.

SEGOVIA, G., PORRAS, A., DEL ARCO, A., MORA, F. Glutamatergic neurotransmission in aging: a critical perspective. *Mech Ageing Dev* 122: 1–29, 2001.

SERAFINI, L.A.; BARROS, N.M.; AZEVEDO, J.L. Biotecnologia na agricultura e na agroindústria. Livraria e editora Agropecuária, Guaíba, RS, 2001, 463p.

SHELINE, Y.I, GADO, M.H., KRAEMER, H. C. Untreated depression and hippocampal volume loss. *Am J Psychiatry* 160: 1516-1518, 2003.

SILVA, C. C., VANDRESEN, F., OLIVEIRA, C. M. A., KATO, L., TANAKA, C. M. A., FERREIRA, H. E. Chemical composition of *Aloysia gratissima* (Gill. et Hook) Tronc. (Verbenaceae). *Biochem Systemat Ecol* 34: 593-595, 2006.

SMITH, M.C., BLECK, T.P. Convulsive Disorders: toxicity of anticonvulsants. *Clin Neuropharmacol* 14: 97-115, 1991.

SOARES, E.L.C.; VENDRUSCOLO, G.S.; EISINGER, S.M.; ZÁCHIA, R.A. Estudo etnobotânico do uso dos recursos vegetais em São João do Polêsine, RS, Brasil, no período de outubro de 1999 a junho de 2001 I – Origem e fluxo do conhecimento. *Rev Brasil PI Med* 6: 69-95, 2004.

SOUZA, A.A., WIEST, J.M. Atividade anti-bacteriana de *Aloysia gratissima* (Gill et Hook) Tronc. (garupa, erva-santa), usada na medicina tradicional no Rio Grande do Sul – Brasil. *Rev Brasil PI Med* 9: 23-29, 2007.

- STONE, T.W., ADDAE, J.I. The pharmacological manipulation of glutamate receptors and neuroprotection. *Eur J Pharmacol* 447: 285-296, 2002.
- SUBHAN, N., ALAM, M.A., AHMED, F., SHAHID, I.J., NAHAR, L., SARKER, S.D. Bioactivity of *Excoecaria agallocha*. *Rev Bras Farmacogn* 18: 521-526, 2008.
- SUN, X., CHAN, L. N., GONG, X., SUCHER, N. J. N-methyl-D-aspartate receptor antagonist activity in traditional Chinese stroke medicines. *Neurosignals* 12:31-38, 2003.
- SZASZ, B.K., MIKE, A., KAROLY, R., GEREVICH, Z., ILLES, P., VIZI, E.S., KISS, J.P. Direct inhibitory effect of fluoxetine on N-methyl-D-aspartate receptors in the central nervous system. *Biol Psychiatry* 62: 1303-1309, 2007.
- TAVARES, R.G., TASCA, C.I., SANTOS, C.E., WAJNER, M., SOUZA, D.O., DUTRA-FILHO, C.S. Quinolinic acid inhibits glutamate uptake into synaptic vesicles from rat brain. *Neuroreport* 11: 249-253, 2000.
- TAVARES, R.G., SANTOS, C.I., ALVES, C.E., PORCIUNCULA, L.B., EMANUELLI, L.O., SOUZA, T. Quinolinic acid stimulates synaptosomal glutamate release and inhibits glutamate uptake into astrocytes. *Neurochem Int* 40, 621-627, 2002.
- TAVARES, R.G.; SCHMIDT, A.P.; TASCA, C.I., SOUZA, D.O. Quinolinic Acid-induced seizures stimulate glutamate uptake into synaptic vesicles from rat brain: effects prevented by Guanine-based purines. *Neurochem Res* 33: 97-102, 2008.
- TAYLOR, S., STEIN, M.B. The future of selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs) in psychiatric treatment. *Med Hypotheses* 66: 14–21, 2005.
- TAYLOR, K.L., BRACKENRIDGE, A.E., VIVIER, M.A., OBERHOLSTER, A. High-performance liquid chromatography profiling of the major carotenoids in *Arapidopsis thaliana* leaf tissue. *J Chromat A* 1121: 83-91, 2006.



TOLOSA, L., MIR, M., ASENSIO, V.J., OLMOS, G., LLADÓ, J. Vascular endothelial growth factor protects spinal cord motoneurons against glutamate-induced excitotoxicity via phosphatidylinositol 3-kinase. *J Neurochem* 105: 1080–1090, 2008.

TOMÉ, AR., FERREIRA, PMP., FREITAS, RM. Inhibitory action of antioxidants (ascorbic acid or  $\alpha$ -tocopherol) on seizures and brain damage induced by pilocarpine in rats. *Arq Neuropsiquiatr* 68: 355-361, 2010.

TROTTI D, DANBOLT NC, VOLTERRA A. Glutamate transporters are oxidant-vulnerable: a molecular link between oxidative and excitotoxic neurodegeneration? *Trends Pharmacol Sci* 19: 328–334, 1998.

TSO, M.M., BLATCHFORD, K.L., CALLADO, L.F., MCLAUGHLIN, D.P., STAMFORD, J.A. Stereoselective effects of ketamine on dopamine, serotonin and noradrenaline release and uptake in rat brain slices. *Neurochem Int* 44: 1-7, 2004.

UCHIYAMA, Y. Autophagic cell death and its execution by lysosomal cathepsins. *Arch Histol Cytol* 64: 233–246, 2001.

ULAK, G., MUTLU, O., AKAR, F.Y., KOMSUOĞLU, F.I., TANYERI, P., ERDEN, B.F. Neuronal NOS inhibitor 1-(2-trifluoromethylphenyl)-imidazole augment the effects of antidepressants acting via serotonergic system in the forced swimming test in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 90: 563-568, 2008.

UTTARA, B., SINGH, AV, ZAMBONI, P, MAHAJAN, RT. Oxidative stress and neurodegenerative diseases: a review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options. *Cur neuropharmacol* 7: 1-10, 2009.

VALENTINE, G.W., SANACORA, G. Targeting glial physiology and glutamate cycling in the treatment of depression. *Biochem Pharmacol* 78: 431-439, 2009.

VANDRESEN, F., SCHMITT, E., KATO, L., OLIVEIRA, C.M.A., AMADO, C.A.B., SILVA, C.C. Constituintes químicos e avaliação das

atividades antibacteriana e antiedematogênica de *Aloysia gratissima* (Gillies & Hook.) Tronc. e *Aloysia virgata* (Ruiz & Pav.) Pers. Verbenaceae. Rev Bras Farmacogn 20: 317-321, 2010.

VENDRUSCOLO, G.S., SIMÕES, C.M.O., MENTZ, L.A. Etnobotânica no rio grande do sul: análise comparativa entre o conhecimento original e atual sobre as plantas medicinais nativas. Pesquisas, Botânica 56: 285-322, 2005.

VIRGILI, F., PAGANA, G., BOURNE, L., RIMBACH, G., NATELLA, F., RICE-EVANS, C., PACKER, L. Ferulic acid excretion as a marker of consumption of a French maritime pine (*Pinus maritima*) barks extract. Free Radic Biol Med 28: 1249-1256, 2000.

VIRGILI, F., MARINO, M. Regulation of cellular signals from nutritional molecules: a specific role for phytochemicals, beyond antioxidant activity. Free Rad Biol Med 45: 1205-1216, 2008.

WANG, R., XU, Y., WU, H.L., LI, Y.B., LI, Y.H., GUO, J.B. The antidepressant effects of curcumin in the forced swimming test involve 5-HT<sub>1</sub> and 5-HT<sub>2</sub> receptors. Eur J Pharmacol 578: 43-50, 2008.

WASOWSKI, M., MARDER, M. Central nervous system activities of two diterpenes isolated from *Aloysia virgata*. Phytomedicine 18: 393-401, 2011.

WONG, M.L., LICINIO, J. Research and treatment approaches to depression. Nat Rev Neurosci 2: 343-351, 2001.

WU, X., KIHARA, T., AKAIKE, A., NIIDOME, T., AND SUGIMOTO, H. PI3K/Akt/mTOR signaling regulates glutamate transporter 1 in astrocytes. Biochem Biophys Res Commun 393:514-518, 2010.

YABE, T., HIRAHARA, H., HARADA, N., ITO, N., NAGAI, T., SANAGI, T., YAMADA, H. Ferulic acid induces neural progenitor cell proliferation *in vitro* and *in vivo*. Neuroscience 165: 515-524, 2010.

YOUDIM, M.B.H. Why Do We Need Multifunctional Neuroprotective and Neurorestorative Drugs for Parkinson's and Alzheimer's Disorders? RMMJ 1: 1-18, 2010.

YU, L., ZHANG, Y., MA, R., BAO, L., FANG, J., YU, T. Potent protection of ferulic acid against excitotoxic effects of maternal intragastric administration of monosodium glutamate at a late stage of pregnancy on developing mouse fetal brain. *Eur Neuropsychopharmacol* 16: 170-177, 2006.

ZENI, A.L.B., BOSIO, F. O uso de plantas medicinais em uma comunidade rural de Mata Atlântica-Nova Rússia, SC. *Neotrop Biol Conserv* 6: 55-63, 2011a.

ZHANG Z.J. Therapeutic effects of herbal extracts and constituents in animal models of psychiatric disorders. *Life Sci* 75: 1659-1699, 2004.

ZHU, L., WU, J., LIAO, H., GAO, J., ZHAO, X. N., ZHANG, Z. X. Antagonistic effects of extract from leaves of *Ginkgo biloba* on glutamate neurotoxicity. *Zhongguo Yao Li Xue Bao* 18: 344-7, 1997.