

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

ENVOLVIMENTO DO SISTEMA MONOAMINÉRGICO
NO EFEITO ANTIDEPRESSIVO DO EXTRATO DAS FOLHAS DE
Schinus molle L. EM CAMUNDONGOS



Daniele Guilhermano Machado

Florianópolis, 2007.

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

**ENVOLVIMENTO DO SISTEMA MONOAMINÉRGICO
NO EFEITO ANTIDEPRESSIVO DO EXTRATO DAS FOLHAS DE
Schinus molle L. EM CAMUNDONGOS**

Daniele Guilhermano Machado

Dissertação de mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências, da Universidade Federal de Santa Catarina, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Neurociências.

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

Departamento de Bioquímica – BQA

Florianópolis, 2007.

*Dedico esta dissertação a minha mãe,
Lúcia do Amarante Guilhermano,
por seu apoio incansável diante das adversidades,
por seu exemplo de fé e desprendimento ao próximo,
por sua conduta moral e seus exemplos diários de coragem,
por me oportunizar vir sua filha e aprender que a
paz de espírito tem valor incalculável.
Obrigada mãe!*

Agradecimentos

À minha orientadora Ana Lúcia Severo Rodrigues pela conduta moral e profissional, por ter me oportunizado trabalhar com as plantas medicinais e o estudo da depressão, pelo grande apoio diário, por sua dedicação, pelos ensinamentos e orientação indispensáveis para meu aprendizado. Admiro seu caráter e seriedade. Que seus passos sempre sejam guiados em um caminho de luz e evolução.

Ao professor Adair R. S. Santos, pela colaboração a este trabalho e à pesquisa. Agradeço principalmente Adair, por meus primeiros passos na pós-graduação como aluna especial. Lembrarei do bons momentos de trabalho com carinho.

Aos primeiros amigos e colegas que fiz, Vinícios e Douglas, obrigado pelos ensinamentos e apoio nos meus momentos difíceis. Que Deus sempre proteja vocês a onde estiverem. Eternamente grata.

A minha segunda mãe, Dona Vilma, obrigada pelo seu zelo, pelo carinho e preocupação, pelas “guloseimas” que ganhei quando não almoçava. Sua ajuda suavizou sofrimentos que passei. Um grande abraço e continue me cuidando tá?

Ao Nivaldo, secretário da Fisiologia e ao Sr. Carlos, sempre simpáticos e atenciosos. Obrigado pelo carinho.

Ao Nivaldo, secretário da Pós-Graduação, por sua colaboração incansável, por sua amizade e incentivo. Que Deus ampare você e sua família. Obrigado pelo apoio por todos estes anos.

Aos colegas do laboratório, Manuella e Ricardo, pela colaboração neste trabalho, e os demais colegas, grata pela convivência diária. Enfim, grande abraço fraternal, a todos meus colegas de mestrado que compartilhei inúmeros dias de minha vida. Sheyla e Marina, obrigada pelas caroninhas nos dias de cansaço, foram de grande valia para mim.

Aos docentes do curso de Pós-Graduação em Neurociências, pelos ensinamentos transmitidos.

Aos professores, Moacir G. Pizzolatti e Inês Maria C. Brighente, pelo fornecimento dos extratos, pela ajuda e colaboração incansáveis na realização deste trabalho e pelo carinho com que me receberam em seus laboratórios.

Aos meus avós maternos, Aristides Guilhermano e Olmira do Amarante Guilhermano, pelo amor e os exemplos de conduta moral, melhor herança que poderiam ter me deixado.

Ao meu afilhado, Bruno Guilhermano Fernandes, pelo o amor, paciência nas vezes em que não pude dar-lhe atenção e por existir em minha vida para ensinar sem palavras quais são as verdadeiras riquezas do ser humano. Obrigado meu filho!

Agradeço também a minha prima-irmã, Francesca do Amarante Guilhermano e ao seu caçula, João Pedro Guilhermano Pereira, pelo amor e por pertencerem de forma especial à minha família.

A Deus, que com seus intercessores ou anjos, sempre nos orientam, nos ensinam a melhorarmos internamente a cada dia, nos guiando em uma trajetória de amadurecimento pessoal e espiritual. Agradeço o conforto, a força, a fé e a coragem em todos os episódios de minha vida, especialmente este.

Aos animais experimentais, veículos indispensáveis para meu aprimoramento, fica aqui registrado minha gratidão, respeito e reconhecimento de que o progresso da ciência está interligado de forma relevante as vossas existências.

Aos índios e a medicina popular em geral, nossos primeiros e incansáveis cientistas. A etnofarmacologia só existe devido as suas pesquisas preliminares e aos vossos “experimentos” milenares e caseiros. Grata, pela colaboração, mesmo que de forma indireta.

Sumário

DEDICATÓRIA.....	i
AGRADECIMENTOS	ii
Sumário	iv
Lista de Abreviaturas	vi
Lista de Figuras	vii
Lista de Tabelas	ix
Resumo	x
Abstrat.....	xi
1. Introdução	1
1.1. Depressão.....	1
1.2. Plantas medicinais como alternativa terapêutica.....	4
1.2.1. <i>Schinus molle</i> L.....	5
2. Justificativa.....	7
3. Objetivos.....	9
3.1. Objetivo geral.....	9
3.2. Objetivos específicos	9
4. Materiais e métodos	10
4.1. Drogas e reagentes	10
4.2. Animais e tratamento	10
4.3. Preparação dos extratos brutos etanólico e hexânico de <i>Schinus molle</i>	11
4.3.1. Obtenção do extrato hexânico.....	13
4.3.2. Obtenção do extrato etanólico	14
4.4. Fracionamento do extrato de <i>Schinus molle</i>	14
4.4.1. Fracionamento do extrato hexânico de <i>Schinus molle</i>	14
4.4.2. Fracionamento do extrato etanólico de <i>Schinus molle</i>	16
4.5. Testes comportamentais.....	17
4.5.1. Teste do nado forçado (TNF).....	18
4.5.2. Teste da suspensão da cauda (TSC).....	19
4.5.3. Teste do Campo Aberto (TCA).....	20
4.6. Investigação do potencial antidepressivo dos extratos etanólico e hexânico das folhas de <i>Schinus molle</i>	21
4.6.1. Análise do mecanismo de ação antidepressiva do extrato hexânico de <i>Schinus molle</i> através de estudos farmacológicos in vivo.....	22
I. Envolvimento do sistema serotoninérgico	22
II. Envolvimento do sistema noradrenérgico.....	23
III. Envolvimento do sistema dopaminérgico.....	23
4.7. Análise Estatística.....	24
5. Resultados.....	25
5.1. A avaliação do efeito antidepressivo do extrato etanólico de <i>Schinus molle</i> no TNF.....	25
5.2. A avaliação do efeito antidepressivo do extrato etanólico de <i>Schinus molle</i> no TSC.....	26
5.3. A avaliação do efeito do extrato etanólico de <i>Schinus molle</i> no TCA.....	27
5.4. A avaliação do efeito antidepressivo do extrato hexânico de <i>Schinus molle</i> e da fluoxetina no TSC.....	28
5.5. A avaliação do efeito do extrato hexânico de <i>Schinus molle</i> no TCA.....	29

5.6. Investigação do mecanismo de ação antidepressiva do extrato hexânico de <i>Schinus molle</i> no TSC.....	30
I. Envolvimento do sistema serotoninérgico	30
II. Envolvimento do sistema noradrenérgico.....	33
III. Envolvimento do sistema dopaminérgico.....	34
5.7. Investigação do potencial antidepressivo dos constituintes isolados dos extratos etanólico e hexânico de <i>Schinus molle</i> no TSC.....	36
5.8. A avaliação dos constituintes isolados dos extratos etanólico e hexânico de <i>Schinus molle</i> no TCA.....	39
6. Discussão ..	40
7. Conclusão ..	47
8. Referências.....	48
9. Anexos.....	56

Lista de Abreviaturas

CCD = Cromatografia em Camada Delgada

CEUA = Comissão de Ética do Uso de Animais

DMSO = dimetilsulfóxido

E.P.M = erro padrão da média

i.p.= intraperitoneal

p.o.= oral

ISRS = inibidor seletivo da recaptação de serotonina

MAO = monoamino oxidase

IMAO = inibidor da monoamino oxidase

NMDA = N-metil-D-aspartato

PCPA = p-clorofenilalanina metil éster

PKC = proteína cinase C

SNC = sistema nervoso central

TPH = triptofano hidroxilase

TNF = teste do nado forçado

TSC = teste da suspensão da cauda

TCA= teste do campo aberto

R_f = Índice de retenção cromatográfica

5-HT = serotonina.

Lista de Figuras

Figura 1. Ilustração de <i>Schinus molle</i>	7
Figura 2. Esquema da preparação dos extratos hexânico e etanólico de <i>Schinus molle</i>	12
Figura 3. Cromatografia de camada delgada do extrato hexânico de <i>Schinus molle</i>	13
Figura 4. Triperpenos isolados da fração III (43-45) de <i>Schinus molle</i>	16
Figura 5. Estrutura da rutina.....	16
Figura 6. Teste do Nado Forçado (TNF).....	18
Figura 7. Teste da Suspensão da Cauda (TSC).....	19
Figura 8. Teste do Campo Aberto (TCA).....	20
Figura 9. Esquema representativo da investigação do potencial antidepressivo dos extratos etanólico e hexânico de <i>Schinus molle</i>	21
Figura 10. Esquema representativo da investigação do mecanismo de ação do extrato hexânico de <i>Schinus molle</i>	24
Figura 11. Efeito do tratamento com extrato etanólico de <i>Schinus molle</i> pelas vias i.p. e p.o. no TNF.....	25
Figura 12. Efeito do tratamento com extrato etanólico de <i>Schinus molle</i> L. por via i.p. e por via p.o. no TSC.....	26
Figura 13. Efeito do tratamento com extrato etanólico de <i>Schinus molle</i> no teste do campo aberto (TCA).....	27
Figura 14. Efeito do tratamento com extrato hexânico de <i>Schinus molle</i> ou fluoxetina por via e p.o. sobre o tempo de imobilidade no TSC.....	28
Figura 15. Efeito do tratamento com extrato hexânico de <i>Schinus molle</i> L. na atividade locomotora dos animais no campo aberto (TCA).....	29
Figura 16. Efeito do pré-tratamento com PCPA, NAN-190, WAY100635, cetanserina, ou MDL72222 na redução do tempo de imobilidade causada pela administração do extrato hexânico de <i>Schinus molle</i> no TSC.....	32
Figura 17. Efeito do pré-tratamento dos animais com prazosim e ioimbina na redução do tempo de imobilidade causada pela administração do extrato de <i>Schinus molle</i> no TSC.....	34
Figura 18. Efeito do pré-tratamento dos animais com SCH 23390 ou sulpirida na redução do tempo de imobilidade causada pela administração do extrato hexânico de <i>Schinus molle</i> no TSC.....	35

Figura 19. Efeito do tratamento por via oral com a rutina, flavonóide isolado do extrato etanólico de <i>Schinus molle</i> sobre o tempo de imobilidade no TSC.....	37
Figura 20. Efeito do tratamento por via oral com a mistura de ésteres de ácidos graxos, mistura de álcoois graxos e mistura de triterpenos obtidos a partir do extrato hexânico de <i>Schinus molle</i> sobre o tempo de imobilidade no TSC.....	38
Figura 21. Efeito do tratamento por via oral com a rutina, flavonóide isolado obtido a partir do extrato etanólico de <i>Schinus molle</i> no teste do campo aberto (TCA).	39
Figura 22. Efeito do tratamento por via oral com a mistura de ésteres de ácidos graxos a partir do extrato hexânico de <i>Schinus molle</i> no teste do campo aberto (TCA).....	40

Lista de Tabelas

Tabela 1. Fracionamento do extrato hexânico de <i>Schinus molle</i> com seus respectivos constituintes.....	15
--	----

Resumo

A *Schinus molle* L. (Anacardiaceae), entre outros usos, é popularmente utilizada para o tratamento da depressão. No presente estudo o efeito dos extratos etanólico e hexânico das folhas de *Schinus molle* foi investigado em camundongos nos testes de nado forçado (TNF) e/ou suspensão da cauda (TSC), modelos preditivos de atividade antidepressiva. O extrato etanólico (600-1000 mg/kg, p.o.) reduziu significativamente o tempo de imobilidade no TSC e provocou redução na locomoção dos animais no teste do campo aberto (TCA), mas não alterou o tempo de imobilidade no TNF. O extrato hexânico reduziu significativamente o tempo de imobilidade no TSC (30-600 mg/kg, p.o.), sem alterar a locomoção no TCA. A eficácia do extrato hexânico foi comparável a da fluoxetina (10 mg/kg, p.o.). A redução do tempo de imobilidade no TSC provocada pelo extrato hexânico (100 mg/kg, p.o.) foi prevenida pelo pré-tratamento dos camundongos com p-clorofenilalanina metil éster (PCPA, 100 mg/kg, i.p., inibidor da síntese de serotonina, por 4 dias consecutivos), NAN-190 (0,5 mg/kg, i.p., antagonista de receptores 5HT_{1A}), WAY100635 (0,1 mg/kg, s.c., antagonista seletivo de receptores 5HT_{1A}), cetanserina (5 mg/kg, i.p., antagonista de receptores 5HT_{2A/2C}), MDL 72222 (0,1 mg/kg, i.p., antagonista de receptores 5HT₃), prazosim (1 mg/kg, i.p., antagonista de receptores α_1 -adrenérgicos), ioimbina (1 mg/kg, i.p., antagonista de receptores α_2 -adrenérgicos), SCH 23390 (0,05 mg/kg, s.c, antagonista de receptores D₁) ou sulpirida (50 mg/kg, i.p., antagonista de receptores D₂). A rutina (1 mg/kg, p.o) isolada do extrato etanólico e a fração I (6-17) isolada do extrato hexânico, a qual corresponde a uma mistura de ésteres de ácidos graxos (10 mg/kg, p.o) reduziram significativamente o tempo de imobilidade no TSC, sem provocar alteração na locomoção no TCA. Porém, as frações II (33-34; composta por uma mistura de álcoois graxos) e III (43-45; mistura de triterpenos), isoladas do extrato hexânico, não alteraram o tempo de imobilidade dos animais no TSC. Podemos concluir que o extrato hexânico de *Schinus molle* produz efeito antidepressivo no TSC, o qual parece ser dependente de uma interação com os sistemas serotoninérgico, noradrenérgico e dopaminérgico. Os resultados fornecem evidência que o extrato hexânico de *Schinus molle* compartilha efeitos farmacológicos semelhantes aos de antidepressivos clássicos, pelo menos em nível pré-clínico e que os ésteres de ácidos graxos (fração 6-17) podem ser responsáveis pela ação deste extrato no TSC. O extrato etanólico de *Schinus molle* também foi eficaz em diminuir o tempo de imobilidade no TSC, sendo que o constituinte isolado rutina parece contribuir para o efeito antidepressivo do mesmo.

Palavras-chave: depressão, dopamina, noradrenalina, *Schinus molle*, serotonina, teste da suspensão da cauda

Abstract

Schinus molle L. (Anacardiaceae), among other uses, is popularly employed for the treatment of depression. In this study, the antidepressant-like effect of the ethanolic and hexanic extracts from leaves of *Schinus molle* was investigated in the mouse tail suspension test (TST) and/or in the forced swimming test (FST), two predictive models of depression. The ethanolic extract (600-1000 mg/kg, p.o.) significantly reduced the immobility time in the TST, but not in the FST, and produced a reduction in the locomotor activity in the open-field test (OF). The immobility time in the TST was significantly reduced by the hexanic extract (dose range 30-600 mg/kg, p.o.), without accompanying changes in ambulation when assessed in an open-field test. The efficacy of this extract was found to be comparable to that of fluoxetine (10 mg/kg, p.o.). The anti-immobility effect of the hexanic extract (100 mg/kg, p.o.) was prevented by pretreatment of mice with p-chlorophenylalanine (PCPA, 100 mg/kg, i.p., an inhibitor of serotonin synthesis, for four consecutive days), NAN-190 (0.5 mg/kg, i.p., a 5-HT_{1A} receptor antagonist), WAY100635 (0.1 mg/kg, s.c., a selective 5-HT_{1A} receptor antagonist), ketanserin (5 mg/kg, i.p., a 5-HT_{2A/2C} receptor antagonist), MDL72222 (0.1 mg/kg, i.p., a 5-HT₃ receptor antagonist), prazosin (1 mg/kg, i.p., an α_1 -adrenoceptor antagonist), yohimbine (1 mg/kg, i.p., an α_2 -adrenoceptor antagonist), SCH23390 (0.05 mg/kg, s.c., a D₁ receptor antagonist) or sulpiride (50 mg/kg, i.p., a D₂ receptor antagonist). Rutin (1 mg/kg, p.o.) isolated from the ethanolic extract and the fraction I (6-17; fatty acid esters), isolated from the hexanic extract significantly reduced the immobility time in the TST, without altering the locomotor activity in the open-field test. However, the fractions II (33-34; composed by a mixture of fatty alcohols) and III (43-45; mixture of triterpenes), isolated from the hexanic extract did not cause changes in the immobility time in the TST. It may be concluded that the hexanic extract of *Schinus molle* produces an antidepressant-like effect that seems to be dependent on its interaction with the serotonergic, noradrenergic and dopaminergic systems. These results provide evidence that the hexanic extract from *S. molle* shares with established antidepressants some pharmacological effects, at least at a preclinical level. Moreover, the fatty acid esters (fraction 6-17) may be responsible for the antidepressant-like action of this extract in the TST. The ethanolic extract of *Schinus molle* significantly reduced the immobility time in the TST. Rutin, isolated from this extract, may be also responsible for the antidepressant-like action.

Keywords: Depression; Dopamine; Noradrenaline; *Schinus molle*, Serotonin; Tail suspension test

1. Introdução

1.1. Depressão

A depressão é um transtorno de humor que vem atingindo de forma crescente a população mundial, constituindo um problema de saúde pública. Esta doença se manifesta através de alterações psicológicas, comportamentais e fisiológicas. Ela apresenta altos índices de cronicidade, recaída e recorrência; prejuízos físicos e psicossociais, além de ser fator de risco para o desenvolvimento de doenças arteriais coronarianas e isquemia cerebral e de estar associada com um alto índice de suicídio (Nemeroff e Owens, 2002; Nestler et al., 2002). A prevalência desta patologia é maior para as mulheres (5 a 20%) do que para os homens (3 a 12%) (Pryce et al., 2005).

Os sintomas que podem ser observados em pacientes deprimidos incluem alterações somáticas e cognitivas como humor deprimido; anedonia (perda de interesse ou satisfação em quase todas as atividades); perda ou ganho de peso ou de apetite; insônia ou hipersonia; retardo ou agitação psicomotora; fadiga ou perda de energia; sentimentos de desvalia ou culpa; diminuição da concentração e pensamentos recorrentes de morte ou suicídio. Para o diagnóstico de um episódio depressivo é necessária a constatação de no mínimo cinco entre estes nove sintomas, sendo um deles obrigatoriamente humor deprimido ou anedonia, presentes na maior parte do tempo, com uma duração mínima de duas semanas (American Psychiatry Association, 1994).

Vários fatores podem predispor um indivíduo ao desenvolvimento de depressão tais como: fatores genéticos, bioquímicos, sócio-econômicos e ambientais. Estudos demonstram que o estresse crônico, definido como um excesso de eventos negativos por pelo menos seis meses pode gerar depressão (Blackburn-Munro e Blackburn-Munro, 2001). Desta forma, a modulação do eixo HPA

(hipotálamo-pituitária-adrenal) está envolvida na fisiopatologia da depressão (Nestler et al., 2002; Nemeroff et al., 2005).

Os primeiros fármacos com efeitos comprovadamente benéficos sobre o humor agiam primariamente sobre o sistema monoaminérgico, como inibidores da enzima monoamina oxidase (MAO), ou inibidores da recaptção de monoaminas (Nemeroff e Owens, 2002). Esta constatação sugeriu que os antidepressivos atuassem por aumento da transmissão serotoninérgica e noradrenérgica, compensando um possível estado de deficiência destes neurotransmissores. Assim surgiu a Hipótese Monoaminérgica da Depressão, que postulava que a depressão era devida à deficiência de neurotransmissores em sinapses monoaminérgicas ou ainda receptores ineficientes (Mann et al., 1996; Wong e Licínio, 2001; Castrén, 2005). No entanto esta hipótese bastante simplista falha ao não explicar a ação de alguns antidepressivos que não agem sobre o sistema monoaminérgico. Além disso, nem toda droga que aumenta as monoaminas na fenda sináptica age como antidepressivos (como por exemplo a anfetamina), além da discrepância temporal que existe entre os eventos bioquímicos rápidos envolvidos no metabolismo de monoaminas e os efeitos clínicos dos antidepressivos (Baldessarini, 1996; Stahl, 2000; Torres et al., 2003). Desta forma, embora já esteja bem estabelecido o envolvimento do sistema monoaminérgico na patogênese da depressão, acredita-se que vários outros sistemas de neurotransmissores e mecanismos de transdução de sinal estejam envolvidos.

O sistema serotoninérgico é amplamente reconhecido como especificamente envolvido na etiologia da depressão e drogas que agem sobre este sistema têm sido largamente utilizadas no tratamento dos distúrbios depressivos (Risch e Nemeroff, 1992; Wong et al., 2005). Uma série de estudos relaciona os receptores serotoninérgicos, especialmente dos sub-tipos 5-HT_{1A/1B}, 5-HT_{2A/2C} e 5-HT₃ na ação central dos antidepressivos (Redrobe e Bourin, 1997; Hensler, 2002; Taylor et al., 2005a).

Estudos têm demonstrado também alterações na transmissão noradrenérgica na depressão (Wong e Licínio, 2001; Taylor et al., 2005a). Várias evidências mostram a participação dos α -adrenoceptores e β -adrenoceptores na ação de fármacos antidepressivos. O bloqueio de α_1 -adrenoceptores está associado

a estados depressivos, enquanto que o tratamento crônico com antidepressivos causa um aumento na densidade e na atividade de α_1 -adrenoceptores no córtex frontal e no hipocampo. O tratamento crônico com antidepressivos também causa uma “down-regulation” dos autoreceptores α_2 -adrenérgicos e dos β_1 -adrenoceptores (Millan, 2004).

Alguns estudos têm postulado que a função dopaminérgica reduzida está implicada na patofisiopatologia da depressão (D’Aquila et al., 2000; Dailly et al., 2004). Foi observada uma “up-regulation” dos transportadores dopaminérgicos no estriado de pacientes com depressão maior (Laasonen-Balk et al., 1999), o que pode ser o fator primário que determina uma menor disponibilidade de dopamina na fenda sináptica (Dailly et al., 2004). O tratamento com antidepressivos aumenta a transmissão dopaminérgica preferencialmente no sistema mesolímbico, deste modo induzindo uma melhora nos sintomas da depressão, tal como a anedonia (D’Aquila et al., 2000; Dailly et al., 2004). Portanto o efeito de antidepressivos sobre a transmissão dopaminérgica parece ter um papel importante no seu efeito terapêutico.

Estudos morfológicos e de neuroimagem funcional de pacientes deprimidos verificaram alterações nas atividades do córtex pré-frontal, amígdala, córtex cingular anterior e diminuição do volume do hipocampo (pós-morte) (Bremmer et al., 2000; Phillips et al., 2003; Pryce et al., 2005). Apesar do mecanismo celular preciso das alterações estruturais em transtornos depressivos não estarem completamente compreendidas, progresso tem sido feito na caracterização de cascatas de transdução de sinais que controlam a atrofia neuronal e morte celular programada. Recentemente, as pesquisas sobre o mecanismo de ação dos antidepressivos têm identificado adaptações na sinalização de proteínas intracelulares e de genes que podem contribuir para ação do tratamento com antidepressivos (Duman et al., 2000; Wong e Licinio, 2001; Duman e Monteggia, 2006). O tratamento crônico com antidepressivos pode influenciar a quantidade e/ou a viabilidade de células hipocâmpais. Tem sido mostrado que o tratamento com antidepressivos (inibidores seletivos da recaptção de serotonina e tricíclicos) produz efeitos neurotróficos/protetores contra vários insultos e pode modular fatores envolvidos na

sobrevivência e crescimento celular, como o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) e proteínas citoprotetoras, por exemplo, a proteína antiapoptótica Bcl-2 (Manji et al., 2000; D'Sa e Duman, 2002; Mattson et al., 2004; Schloss et al., 2004; Dranovsky et al., 2006; Zarate et al., 2006).

Vários outros sistemas de neurotransmissores estão implicados na patofisiologia da depressão, incluindo o glutamatérgico (Skolnick, 1999; Skolnick et al., 2001), GABAérgico (Nowak, et al., 2006) e opióide (Shirayama et al., 2004).

A terapia atualmente disponível para o tratamento da depressão é freqüentemente associada com vários efeitos colaterais e é efetiva somente em cerca de 70% dos pacientes (Wong e Licinio, 2001; Nestler et al., 2002). Portanto, a identificação de novas alternativas terapêuticas para o tratamento da depressão ainda se torna necessária.

1.2. Plantas medicinais como alternativa terapêutica

Segundo a Organização Mundial da Saúde devido a dificuldades econômicas e falta de acesso a medicamentos, cerca de 65-80% da população mundial que vive em países em desenvolvimento depende essencialmente das plantas para seus cuidados primários de saúde (Calixto, 2005). Na Ásia, América Latina, África e Índia, por exemplo, o uso extensivo de plantas medicinais como remédios para tratamento de diversas doenças é uma prática comum (Schmourlo et al., 2005; Ruffa et al., 2002).

Diferentes regiões do mundo têm registrado o uso de plantas medicinais com efeitos psicotrópicos, oferecendo desta forma um vasto repertório de substâncias potencialmente ativas que podem atuar na farmacologia moderna (Zhang, 2004). Atualmente, quase 25 % das drogas convencionais, são originadas diretamente ou indiretamente de plantas, tais como: ioimbina (antagonista de receptores α_2 -adrenérgicos), efedrina, tubocarina (curare), galantamina, sendo que estas descobertas surgiram através de estudos em comunidades indígenas (De Smet, 1997; Carlini, 2003; Houghton e Seth, 2003; Zhang et al., 2004).

O uso clínico de medicamentos com ação antidepressiva obtidos de plantas ainda é bastante limitado. Atualmente o *Hypericum perforatum* (erva de São João), um membro da família Hypericaceae, tem sido muito empregado mundialmente como antidepressivo (Harrison, 1998; Ernest, 1999; Butterweck et al., 2000, 2003a, 2003b, McGarry et al., 2006). Linde et al. (1996) demonstraram que os extratos de *Hypericum* são mais eficientes do que placebo para o tratamento de transtornos depressivos leves e moderados. *Hypericum perforatum* possui propriedades serotoninérgicas, pois inibe a recaptação de serotonina. As suas principais substâncias ativas parecem ser a hipericina e a hiperforina. A última é o principal constituinte lipofílico da planta e inibe a recaptação de serotonina, noradrenalina e dopamina, aumentando as suas concentrações na fenda sináptica (Chatterjee et al., 1998). Além disso, foi demonstrado que o *Hypericum caprifoliatum*, planta existente no sul do Brasil, produz efeito antidepressivo no TNF e inibe a recaptação sinaptossomal de monoaminas (Viana et al., 2005).

Há vários relatos na literatura de atividade antidepressiva de extratos de plantas e/ou substâncias ativas isoladas de plantas, tais como *Curcuma longa* (Yu et al., 2002), *Morinda officinalis* (Li et al., 2001; Soon e Tan, 2002), *Siphocampylus verticillatus* (Rodrigues et al., 2002), *Salvia elegans* (Herrera-Ruiz et al., 2006), *Canavalia brasiliensis* (Barauna et al., 2006), principalmente no teste do nado forçado (TNF) e no teste da suspensão da cauda (TSC), modelos animais preditivos de atividade antidepressiva.

Neste trabalho a *Schinus molle*, espécie conhecida como aroeira, aroeira-mansa ou aroeira-vermelha será objeto de estudo quanto ao seu potencial antidepressivo.

1.2.1. *Schinus molle* L.

Schinus molle L. é uma árvore pertencente à família Anacardiaceae, originária da América do Sul e introduzida em várias regiões tropicais e subtropicais do mundo, incluindo o sul do Brasil (Taylor,

2005b; Lorenzi e Matos, 2002). A *Schinus molle* é também conhecida como aroeira-mansa, aroeira-mole, aroeira-da-praia, aroeira-salsa, aroeira-vermelha, corneíba, fruto-de-sabiá e pimenteiro.

As características gerais da aroeira-mansa correspondem a uma árvore de 5-8 m de altura, de copa globosa com ramos flexíveis e pendentes, folhas aromáticas, tronco cilíndrico com 25-35 cm de diâmetro, flores pequenas e frutos esféricos, conforme ilustrado na Figura 1 (Lorenzi e Matos, 2002).

A *Schinus molle* é utilizada para diversas finalidades: a) uso da sua madeira para construção de casas e móveis rústicos; b) uso de suas frutas para fabricação de uma bebida alcoólica conhecida como “chicha de molle” ou vinagre, obtida após fermentação; c) uso das suas folhas na medicina popular como: anti-reumática, antiinflamatório, anti-hemorragica, anti-séptica, fungicida, bactericida, cicatrizante, laxativo leve, adstringente, cardiotônica, estimulante digestivo, diurética, estimulante menstrual, estimulante, tônica e antidepressiva (Ruffa et al., 2002; Taylor, 2005b).

Estudos farmacológicos realizados com extratos de *Schinus molle* mostraram que esta planta exerce várias atividades, entre elas: anti-hipertensiva (Bello et al., 1996; Olafsson et al., 1996), antitumoral (Ruffa et al., 2002), antifúngica (Quiroga et al., 2001; Schmourlo et al., 2005), antiespasmódica (Bello et al., 1998), antiinflamatória (Yueqin et al., 2003) e analgésica (Barrachina et al., 1997). Além disso, estudos com o extrato metanólico desta planta mostraram ação citotóxica contra carcinoma hepatocelular humano *in vitro* (Ruffa et al., 2002) e experimentos com triterpenos e flavonóides isolados dos frutos desta planta mostraram que esses compostos possuem atividade antiinflamatória em um modelo crônico de inflamação (Yueqin et al., 2003). Os triterpenos constituem um dos principais componentes dos frutos de *Schinus molle* (Pozzo-Balbi et al., 1978).

Recentemente, dados experimentais evidenciaram que o extrato hexânico da *Schinus molle* também apresenta atividade inseticida e repelente contra o *Triatoma infestans* (vetor da doença de Chagas) e atividade antimicrobiana contra *Streptococcus pneumoniae* (Ferrero et al., 2006; Molina-Salina et al., 2007).



Figura 1. *Schinus molle* L. (**A:** talos/folhas e flores, **B:** frutos).

2. Justificativa

Existem várias classes de medicamentos antidepressivos usados para o tratamento da depressão como os tricíclicos, os inibidores da monoamina oxidase (MAO), os inibidores seletivos da recaptção de serotonina (ISRS) e os inibidores mistos da recaptção de serotonina e noradrenalina. No entanto, estes fármacos proporcionam uma completa remissão para apenas cerca de 70% dos indivíduos, (Wong e Licínio, 2001; Nestler, 2002), além de causarem efeitos colaterais (Brunello et al., 2002). Além disto, a resposta terapêutica destes fármacos só ocorre 3-5 semanas após o início do tratamento. Sendo assim, existe uma grande necessidade do desenvolvimento de terapias antidepressivas alternativas ou de substâncias que possam aumentar a eficácia clínica no tratamento da depressão.

Terapias com plantas medicinais podem ser alternativas efetivas no tratamento da depressão, como no caso da erva de São João (Whiskey et al., 2001; Bilia et al., 2002; Linde e Knüppel, 2005).

A pesquisa de farmacoterapias com plantas medicinais para doenças psiquiátricas, incluindo a depressão, tem progredido significativamente na última década (Zhang, 2004). É interessante notar que a maioria dos tratamentos para depressão (incluindo a erva de São João) parece agir por mecanismos que não diferem significativamente dos antidepressivos clássicos.

Apesar do uso etnofarmacológico da *Schinus molle* para o tratamento da depressão (Taylor, 2005b), não há evidências de estudos científicos de que esta planta apresente atividade antidepressiva em modelos animais de depressão. Portanto, este trabalho tem o intuito de primeiramente, investigar o efeito antidepressivo dos extratos etanólico e hexânico de *Schinus molle*, nos teste do nado forçado e/ou teste de suspensão da cauda, modelos preditivos de atividade antidepressiva (Porsolt et al., 1977; Steru et al., 1985; Cryan et al., 2005) e secundariamente examinar através de procedimentos farmacológicos a possível participação do sistema monoaminérgico nesta ação antidepressiva. Também será iniciado um estudo da avaliação da ação antidepressiva de compostos isolados desta planta no TSC. Desta forma, o presente trabalho poderia fornecer subsídios científicos para a utilização etnofarmacológica desta planta no tratamento da depressão.

3. Objetivos

3.1. Objetivo geral

Investigar a ação antidepressiva de *Schinus molle* L. em modelos animais preditivos de atividade antidepressiva, estudando seu mecanismo de ação.

3.2. Objetivos específicos:

- a) Verificar o efeito do extrato etanólico de *Schinus molle*, administrado pelas vias intraperitoneal (i.p.) e oral (p.o.), no teste do nado forçado (TNF) e no teste da suspensão da cauda (TSC) em camundongos.
- b) Investigar o efeito do extrato etanólico de *Schinus molle* na atividade locomotora de camundongos no teste do campo aberto.
- c) Verificar o efeito do extrato hexânico de *Schinus molle*, administrado pelas vias i.p. e p.o., no TSC em camundongos.
- d) Investigar o efeito do extrato hexânico de *Schinus molle* na atividade locomotora de camundongos no teste do campo aberto.
- e) Investigar a participação dos sistemas serotoninérgico, noradrenérgico e dopaminérgico no efeito antidepressivo do extrato hexânico de *Schinus molle* no TSC.
- f) Investigar os possíveis constituintes químicos da *Schinus molle* que produzem ação antidepressiva no TSC.

4. Materiais e Métodos

4.1. Drogas e reagentes

As seguintes drogas e solventes foram utilizados: p-clorofenilalanina metil éster (PCPA), fluoxetina, 1-(2-metoxifenil)-4-[2-ftalimido]butil]piperazina (NAN-190), n-{2-[4-(2-metoxifenil)-1-piperazinil]etil}-N-(2-piridinil) ciclohexanecarboxamida (WAY 100635), tartarato de cetanserina, tropanil 3,5-diclorobenzoato (MDL 72222), R(+)-sulpirida, hidrocloreto de prazosim, hidrocloreto de ioimbina, (R)-(+)-7-cloro-8-hidroxi-3-metil-1-fenil-2,3,4,5-tetrahydro-1H-3-bezazepina hidrocloreto (SCH 23390), dimetilsulfóxido (DMSO) e Tween 80. Todas as drogas foram administradas em um volume constante de 10 ml/kg de peso corporal do animal por via i.p., com exceção do SCH 23390 e do WAY 100635 que foram administradas por via subcutânea (s.c.) e da fluoxetina que foi administrada por via oral (p.o.). As drogas foram dissolvidas em salina com exceção de NAN-190 e MDL 72222, que foram diluídas em salina com 1 % de Tween 80 e sulpirida que foi diluída em salina com 5 % de DMSO. Os animais controles receberam os veículos apropriados.

4.2. Animais e tratamento

Camundongos Swiss machos adultos (35-45g) mantidos a temperatura de 22-25°C com livre acesso à água e comida, em ciclo claro/escuro 12:12 h (ciclo claro iniciando às 7:00 h) foram utilizados. Todos os experimentos foram realizados entre 11:00 e 17:00 h, com cada animal usado somente uma vez (N=5-12 animais por grupo). Os animais foram fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina e mantidos no Biotério Setorial do Departamento de Bioquímica. Os

procedimentos realizados foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Catarina (CEUA).

Os animais foram tratados com os extratos de *Schinus molle* por via i.p. ou p.o. e foram testados após 30 minutos ou 60 minutos, respectivamente nos testes comportamentais. Os extratos etanólico e hexânico de *Schinus molle* foram dissolvidos em salina contendo 10% de Tween 80. O grupo controle foi tratado com o respectivo veículo. Em experimentos adicionais foram testados os efeitos de alguns constituintes isolados do extrato etanólico (rutina) e do extrato hexânico (fração 6-17 que corresponde a uma mistura de ésteres de ácidos graxos, fração 33-34 composta por uma mistura de álcoois graxos e fração 43-45 constituída por uma mistura de triterpenos), no TSC.

4.3. Preparação dos extratos brutos etanólico e hexânico de *Schinus molle*

A preparação dos extratos etanólico e hexânico de *Schinus molle*, bem como as análises químicas dos constituintes foram realizadas no Departamento de Química-UFSC e do laboratório de cromatografia do IPTB – FURB, em Blumenau sob a orientação/ responsabilidade dos professores Moacir G. Pizzolati e Inês C. Maria Brighente.

A coleta do material vegetal (talos e folhas) de *Schinus molle* L. (Anacardiaceae) foi realizada em março de 2005, no bairro Santa Mônica em Florianópolis, Santa Catarina. Esta espécie foi identificada pelo Dr. Daniel de Barcellos Falkenberg, Departamento de Botânica, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). A exsicata (FLOR 34.411) foi depositada no Departamento de Botânica do Herbário da UFSC, SC, Brasil.

As folhas e galhos foram submetidos à secagem a 40 °C em estufa com circulação de ar. Após a secagem, o material foi moído em moinho de facas.

A Figura 2 demonstra esquematicamente a preparação dos extratos hexânico e etanólico de *Schinus molle*, resumindo-se da seguinte forma:

- Primeiramente as folhas foram colocadas em maceração durante 15 dias com hexano, rendendo o extrato hexânico (**EH**) e uma quantidade razoável de material vegetal.
- Posteriormente foi realizada a filtração deste material vegetal.
- Após filtração, o mesmo material vegetal foi submetido à maceração com etanol, para originar o extrato etanólico (**EE**).

Estes extratos foram concentrados até a completa eliminação do solvente em evaporador rotatório sob pressão reduzida. Após foram encaminhados para os procedimentos de fracionamento e isolamento de seus constituintes ativos.

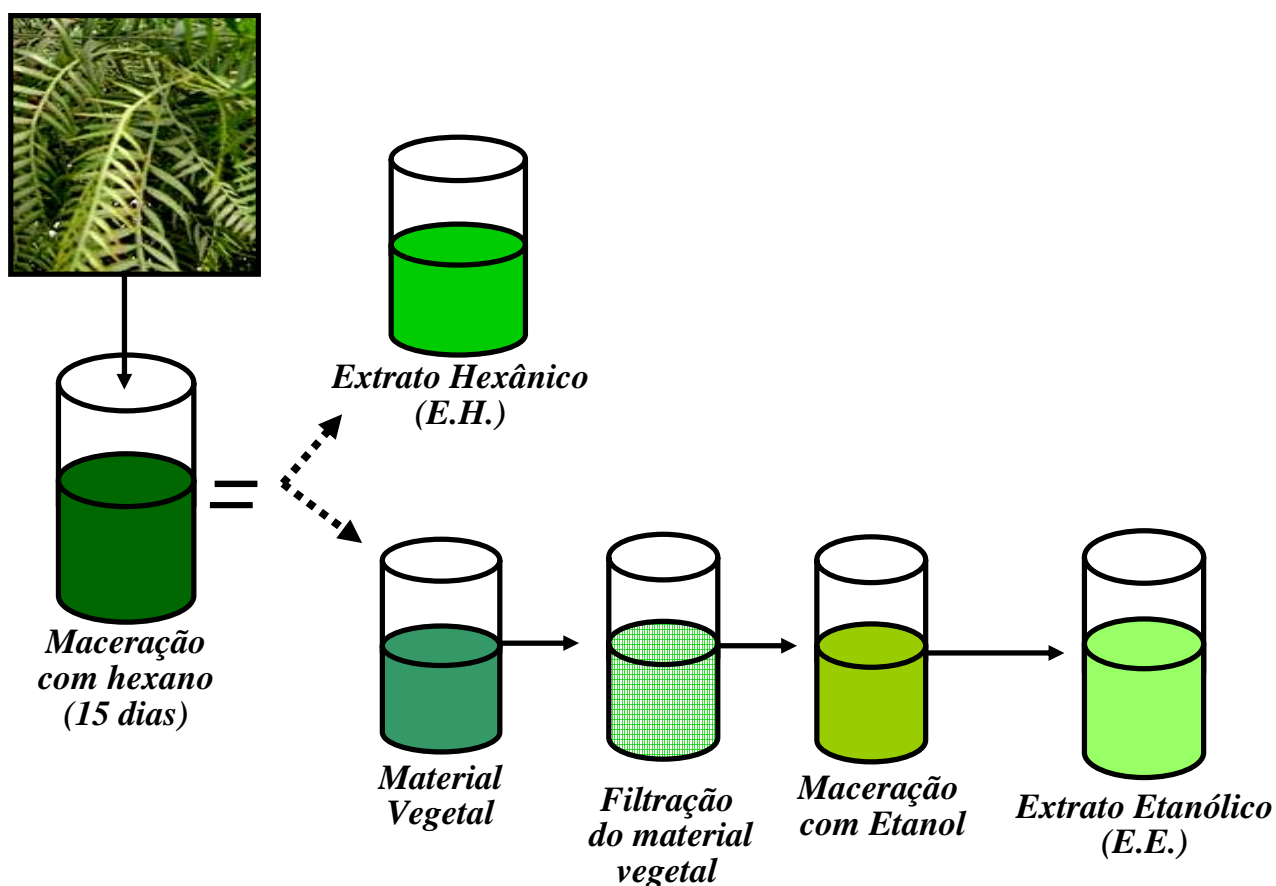


Figura 2. Esquema da preparação dos extratos hexânico e etanólico de *Schinus molle*.

4.3.1. Obtenção do extrato hexânico:

O extrato hexânico foi obtido a partir das folhas e talos de *Schinus molle* (390 g). O material seco foi macerado em hexano à temperatura ambiente (25 ± 2 °C) por 15 dias. O extrato foi filtrado e concentrado em pressão reduzida (aproximadamente 60 °C). A maceração foi repetida por três vezes. A evaporação do solvente produziu um resíduo de 17,8 g de extrato seco (4,6 % de rendimento). O resíduo restante foi mantido sob refrigeração e dissolvido em salina com 10% de Tween 80 antes dos testes comportamentais.

Uma caracterização preliminar do extrato foi realizada por cromatografia em camada delgada, conforme mostra a Figura 3.

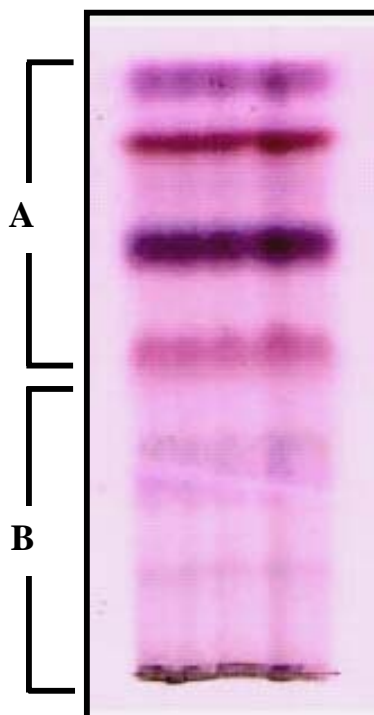


Figura 3. Cromatografia em camada delgada do extrato hexânico de *Schinus molle*, indicando a presença de ésteres e álcoois de ácidos graxos (**A**) e mistura de triterpenos (**B**).

4.3.2. Obtenção do extrato etanólico:

O extrato etanólico foi obtido por maceração exaustiva com etanol à temperatura ambiente após a do material vegetal previamente submetido à maceração com hexano e filtração (Figura 2). A evaporação do solvente produziu um resíduo de extrato seco, o qual foi mantido sob refrigeração. O resíduo restante foi mantido sob refrigeração e dissolvido em salina com 10% de Tween 80 antes dos testes comportamentais.

4.4. Fracionamento do extrato de *Schinus molle*

4.4.1. Fracionamento do extrato hexânico de *Schinus molle*

Os extratos, depois de concentrados, foram fracionados utilizando técnicas de cromatografia em coluna, analisados por cromatografia em camada delgada (CCD) e as frações que apresentaram menor índice de impurezas foram submetidas a cristalização, para a obtenção dos compostos isolados puros.

O extrato hexânico foi particionado em coluna cromatográfica utilizando sílica gel eluída com sistema de solventes em ordem crescente de polaridade, hexano e acetato de etila. As frações coletadas foram reunidas segundo semelhança por CCD, fornecendo as frações I (6-17), II (33-34) e III (43-35).

A fração I (6-17) foi analisada por CCD usando o sistema de solvente hexano/acetato de etila 80/20. Posteriormente esta amostra foi submetida à análise por espectroscopia de Infra Vermelho e cromatografia gasosa, indicando se tratar de uma mistura de ésteres de ácidos graxos saturados e insaturados.

A fração II (33-34) foi analisada por CCD indicando se tratar de uma mistura de álcoois graxos.

A Fração III (43-45), após recristalização em acetona foi analisada por espectroscopia de infravermelho, ressonância magnética nuclear de próton ^1H e carbono ^{13}C , revelando ser uma mistura de triterpenos ácidos, o ácido isomasticadienonico (1) e ácido masticadienonico (2), demonstrado na Figura 4. Após a recristalização a mistura se apresentou na forma de cristais brancos e com ponto de fusão igual a 145 a 146°C.

Um resumo das frações obtidas a partir do fracionamento do hexânico de *Schinus molle* e seus respectivos constituintes encontram-se na Tabela 1, a seguir.

<u>Ordem da Fração:</u>	<u>Constituintes:</u>
Fração I (6-17)	Mistura de ésteres de ácidos graxos saturados e insaturados
Fração II (33-34)	Mistura de álcoois graxos
Fração III (43-45)	Mistura de triterpenos

Tabela 1. Fracionamento do extrato hexânico de *Schinus molle* com seus respectivos constituintes.

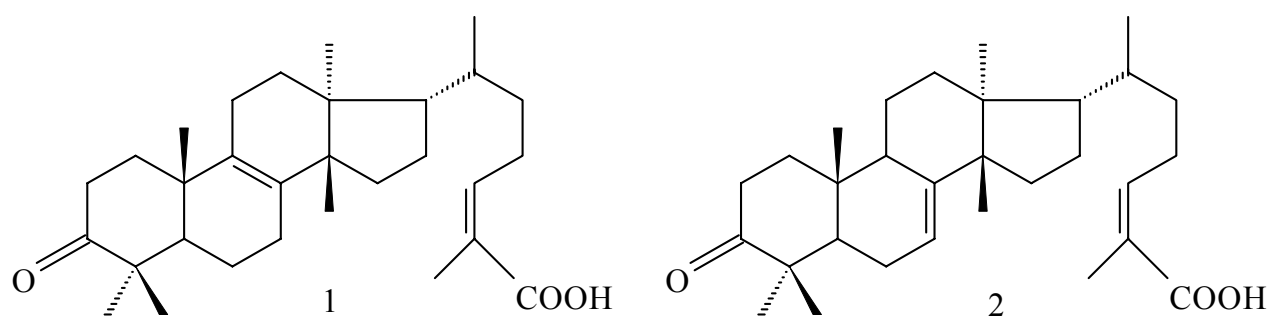


Figura 4. Triperpenos isolados da fração III (43-45) de *Schinus molle*, ácido isomasticadienónico (1) e ácido masticadienónico (2).

4.4.2. Fracionamento do extrato etanólico de *Schinus molle*

No extrato etanólico após concentração em rotaevaporador houve a formação de um sólido amarelo-esverdeado, que foi filtrado, rendendo 4,96% em peso a partir do extrato seco. Após recristalização em metanol, o precipitado foi submetido a análises espectroscópicas de infravermelho, ressonância magnética nuclear de próton ^1H e de carbono ^{13}C , indicando que o composto era o flavonóide glicosilado quercetina-3-O-(6''-O- α -ramnosil)- β -glicosídeo (Rutina), ilustrado na Figura 5.

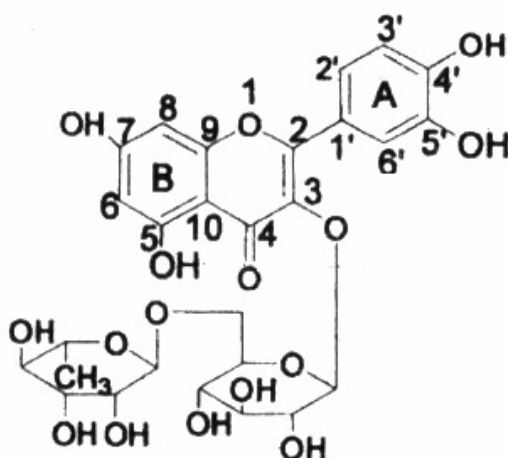


Figura 5. Estrutura da rutina

Finalmente, para total certeza sobre a identidade da amostra, analisou-se através de CCD em três distintos solventes, a amostra juntamente com rutina (padrão). Os dados foram analisados através dos valores de R_f (Índice de retenção cromatográfica) no qual corresponde a relação entre a distância percorrida pelo extrato aplicado na sílica gel e a distância percorrida pelo solvente em que a sílica foi embebida na CCD.

4.5. Testes comportamentais

Neste trabalho foram utilizados dois modelos comportamentais para avaliar a atividade antidepressiva da *Schinus molle*: o teste do nado forçado e o teste da suspensão da cauda. Ambos os modelos são amplamente utilizados na literatura como preditivos de atividade antidepressiva (Cryan et al., 2002; Petit-Demouliere et al., 2005; Bourin et al., 2005; Deussing, 2006; Cryan e Slattery, 2007).

4.5.1. Teste do nado forçado (TNF)

Este modelo foi proposto por Porsolt *et al.* (1977) e baseia-se na observação de que quando os animais são submetidos a uma situação onde não há possibilidade de escape, após um período de agitação inicial, adotam uma postura de imobilidade. O camundongo é considerado imóvel quando ele flutua ou faz movimentos necessários apenas para manter sua cabeça acima da água (Figura 6). O tempo de imobilidade foi cronometrado durante 6 minutos em um cilindro plástico de 10 cm de diâmetro e 24 cm de altura contendo 19 cm de altura de água, à temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ conforme descrito anteriormente (Zomkowski *et al.*, 2004; Kaster *et al.*, 2005). Os antidepressivos clássicos reduzem o tempo de imobilidade nesse teste (Porsolt *et al.*, 1977).



Figura 6. Teste do Nado Forçado (TNF).

4.5.2. Teste da suspensão da cauda (TSC)

O tempo total de duração da imobilidade foi medido de acordo com o método Steru et al. (1985). Os camundongos acústica e visualmente isolados foram suspensos 50 cm acima do chão por fita adesiva e a imobilidade foram registrada durante 6 minutos (Figura 7). Os antidepressivos reduzem o tempo de imobilidade neste teste (Steru et al., 1985, Rodrigues et al., 2002; Mantovani et al., 2003, Cryan et al., 2005).



Figura 7. Teste da Suspensão da Cauda (TSC).

4.5.3. Atividade locomotora no teste do campo aberto (TCA)

A fim de excluir a possibilidade de que a diminuição do tempo de imobilidade no TNF ou no TSC seja devido a uma estimulação motora, os animais foram submetidos ao teste do campo aberto, conforme descrito anteriormente (Rodrigues et al., 1996). O teste foi realizado em uma caixa de madeira medindo 40x60x50 cm, com o chão dividido em 12 quadrantes iguais. O número de quadrantes cruzados com todas as patas em uma sessão de 6 minutos foi o parâmetro utilizado para a avaliação da atividade locomotora (Figura 8A e B).

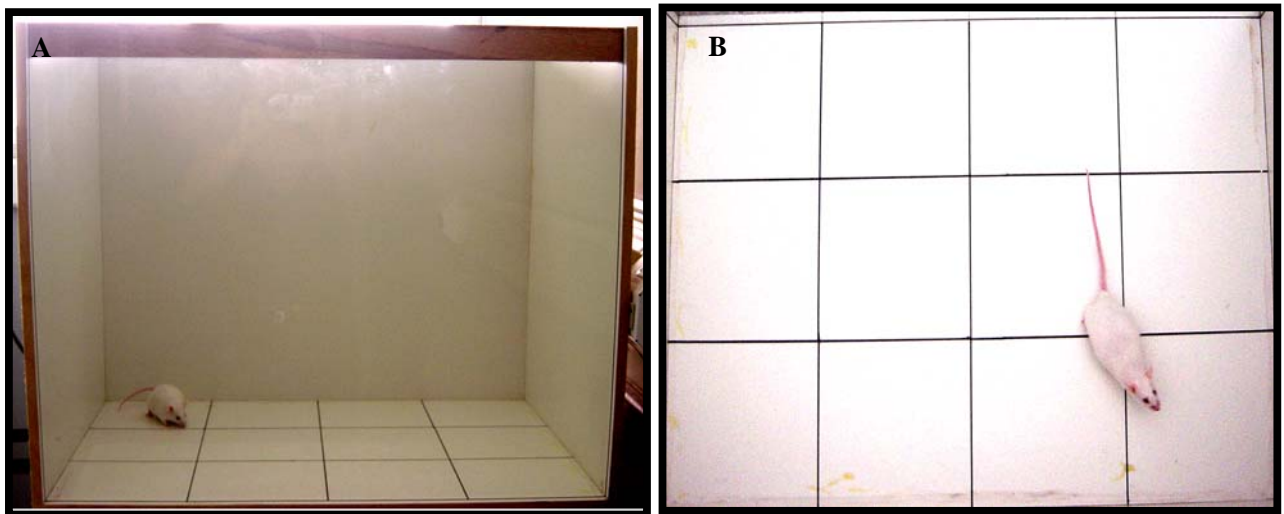


Figura 8. Teste do Campo Aberto (TCA), **A** (visão frontal) e **B** (visão superior).

4.6. Investigação do potencial antidepressivo dos extratos etanólico e hexânico das folhas de *Schinus molle*.

Primeiramente foi realizada uma curva dose-resposta de extrato etanólico de *Schinus molle* no TNF e no TSC. Posteriormente, foi realizada uma curva dose-resposta do extrato hexânico no TSC. Os animais foram submetidos ao TCA, para avaliar a atividade locomotora e descartar possível efeito psicoestimulante dos extratos de *Schinus molle*.

Partindo deste “screening” inicial foram selecionados o extrato da planta, a via de administração e o teste comportamental que melhor ilustrassem o potencial antidepressivo da *Schinus molle*, para posterior investigação do mecanismo de ação, conforme mostrado esquematicamente na Figura 9.

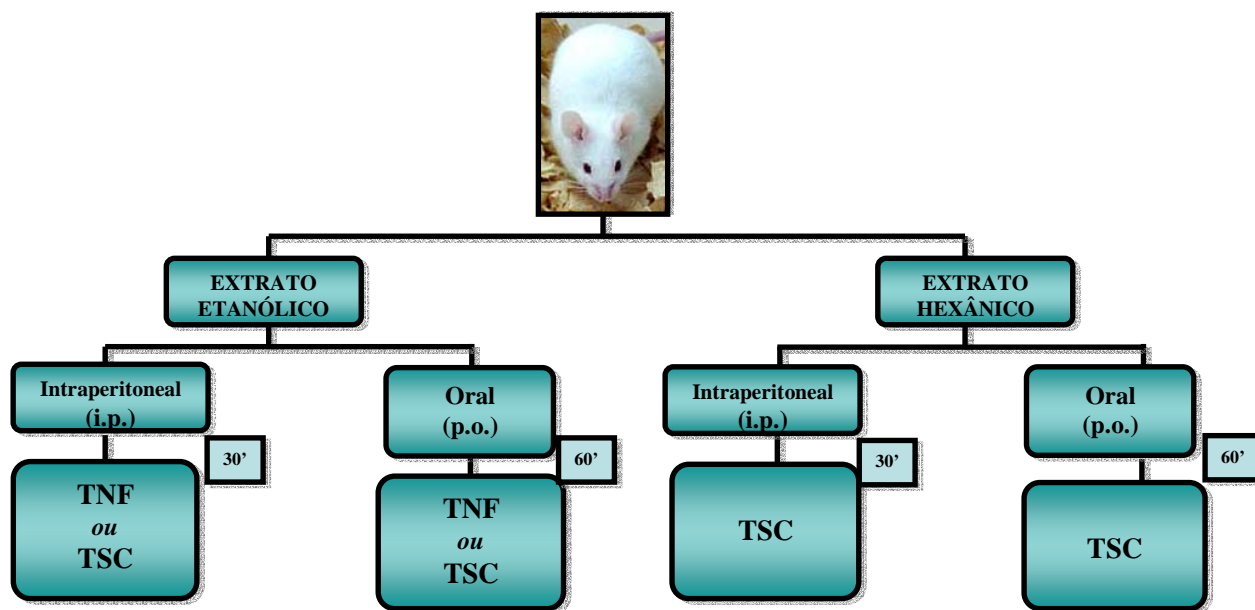


Figura 9. Esquema representativo da investigação do potencial antidepressivo dos extratos etanólico e hexânico de *Schinus molle*, curva dose-resposta (vias de administração i.p. e p.o.) no TNF e/ou TSC.

4.6.1. Análise do mecanismo de ação antidepressiva do extrato hexânico de *Schinus molle* através de estudos farmacológicos *in vivo*

Nesta etapa do trabalho procurou-se investigar os possíveis mecanismos de ação antidepressiva do extrato hexânico de *Schinus molle* através dos seguintes experimentos, conforme mostrado esquematicamente na Figura 10.

I. Envolvimento do sistema serotoninérgico

A fim de investigar o envolvimento do sistema serotoninérgico na ação antidepressiva do extrato hexânico de *Schinus molle*, os camundongos foram tratados com o inibidor da síntese de serotonina, PCPA conforme descrito previamente (Rodrigues et al., 2002; Kaster et al., 2005). O tratamento com PCPA (100 mg/kg, i.p.) foi feito uma vez ao dia, durante quatro dias consecutivos. Vinte e quatro horas após a última injeção de PCPA, o extrato (100 mg/kg, p.o.) foi administrado e os animais foram submetidos ao TSC após 60 minutos. A eficácia do extrato foi comparável ao efeito da fluoxetina (10 mg/kg, p.o., inibidor seletivo da recaptação de serotonina - ISRS), o qual foi utilizada como controle positivo.

A fim de investigar a participação de subtipos de receptores serotoninérgicos no efeito antidepressivo do extrato hexânico de *Schinus molle*, os camundongos foram pré-tratados com NAN-190 (0,5 mg/kg, i.p., antagonista de receptores 5-HT_{1A}), WAY100635 (0,1 mg/kg, s.c., antagonista seletivo de receptores 5-HT_{1A}), cetanserina (5 mg/kg, i.p., antagonista de receptores 5-HT_{2A}) ou MDL 72222 (0,1 mg/kg, i.p., antagonista de receptores 5-HT₃) e após 30 minutos o extrato de *Schinus molle*

(100 mg/kg, p.o.) foi administrado. Transcorridos 60 minutos os animais foram submetidos ao TSC (Zomkowski et al., 2004; Kaster et al., 2005).

II. Envolvimento do sistema noradrenérgico

Os camundongos foram pré-tratados com prazosim (1 mg/kg, i.p., antagonista α_1 -adrenérgico) ou ioimbina (1 mg/kg, i.p., antagonista α_2 -adrenérgico) 30 minutos antes da administração do extrato de *Schinus molle* (100 mg/kg, p.o.). Transcorridos 60 minutos os camundongos foram submetidos ao TSC (Rodrigues et al., 2002; Zomkowski et al., 2004).

III. Envolvimento do sistema dopaminérgico

Os camundongos foram pré-tratados com SCH 23390 (0,05 mg/kg, s.c., antagonista de receptores dopaminérgicos D_1) ou sulpirida (50 mg/kg, i.p., antagonista de receptores dopaminérgicos D_2). Após 30 minutos os animais foram tratados com o extrato de *Schinus molle* (100 mg/kg, p.o.) e após 60 minutos submetidos ao TSC (Barauna et al., 2006).

As doses das drogas utilizadas para a investigação dos possíveis mecanismos de ação antidepressiva do extrato hexânico de *Schinus molle* foram selecionadas a partir de dados da literatura ou de estudos prévios em nosso laboratório (Redrobe e Bourin, 1997; O'Neill e Conway, 2001; Rodrigues et al., 2002; Yamada et al., 2004; Kaster et al., 2005).

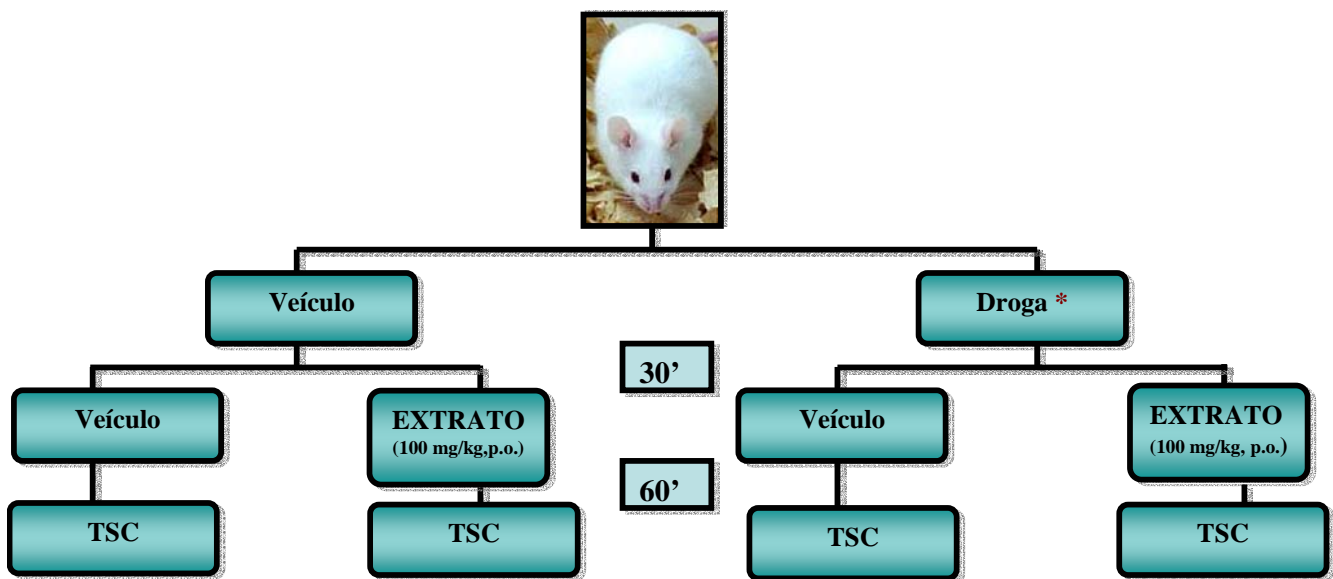


Figura 10. Esquema representativo da investigação do mecanismo de ação do extrato hexânico de *Schinus molle*. Droga *, indica os antagonistas específicos dos sistemas serotoninérgico, noradrenérgico ou dopaminérgico utilizados neste estudo.

4.7. Análise estatística

Os resultados estão apresentados como média + E.P.M. Os dados foram analisados por análise de variância (ANOVA) de uma ou duas vias, conforme o protocolo experimental, seguida do teste *post-hoc* de Tukey (HSD), quando apropriado. Foram considerados significativos os valores de $P < 0,05$.

5. Resultados

5.1. A avaliação do efeito antidepressivo do extrato etanólico de *Schinus molle* no TNF.

Os resultados apresentados na Figura 11 mostram o efeito do tratamento dos animais com o extrato etanólico de *Schinus molle* (100-1000 mg/kg) administrado pelas vias i.p. (A) e oral (B) no tempo de imobilidade no TNF. A ANOVA de uma via não revelou um efeito significativo do tratamento [$F(4,22)=0,90$, $P=0,47$] e [$F(4,27)=1,20$, $P=0,33$], respectivamente.

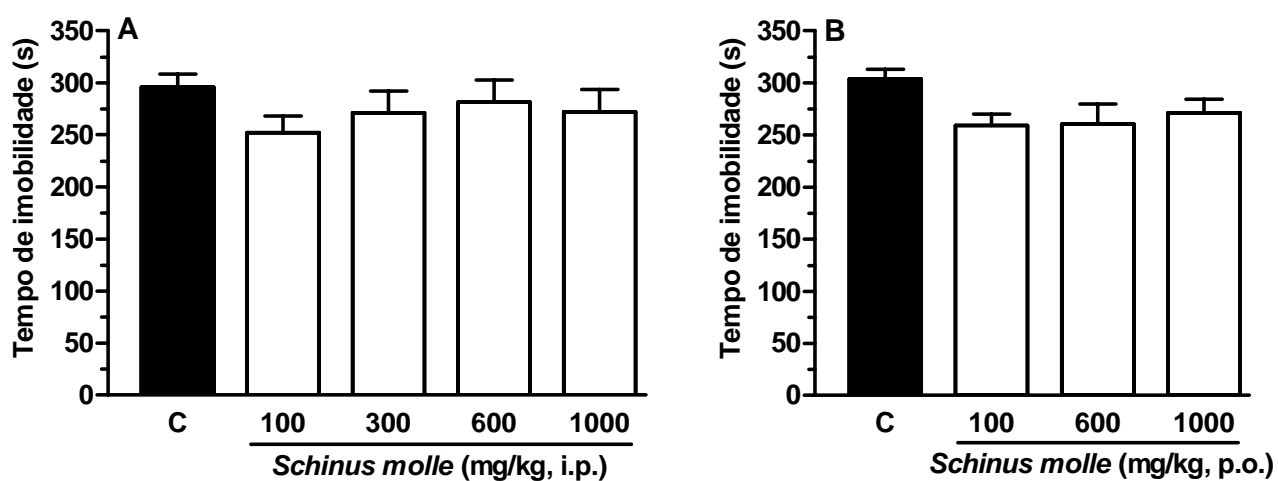


Figura 11. Efeito do tratamento com extrato etanólico de *Schinus molle* pelas vias i.p. (A) e oral (B) no TNF. Cada coluna representa a média + EPM (N=4-7).

5.2. A avaliação do efeito antidepressivo do extrato etanólico de *Schinus molle* no TSC

Os resultados da Figura 12A mostram o efeito do tratamento dos animais com o extrato etanólico de *Schinus molle* (100-1000 mg/kg) administrado por via i.p. no TSC. A ANOVA de uma via não revelou um efeito significativo do tratamento sobre o tempo de imobilidade no TSC [$F(4,25)=1,34$, $P=0,28$]. A Figura 12B mostra o efeito do tratamento dos animais com o extrato etanólico de *Schinus molle* administrado por via oral (300-1000 mg/kg) no TSC. A ANOVA de uma via revelou um efeito significativo do tratamento por via oral [$F(4,27)=6,27$, $P<0,01$]. O teste *post-hoc* mostrou que os animais tratados com as doses de 600 e 100 mg/kg, p.o. apresentaram uma redução no tempo de imobilidade no TSC.

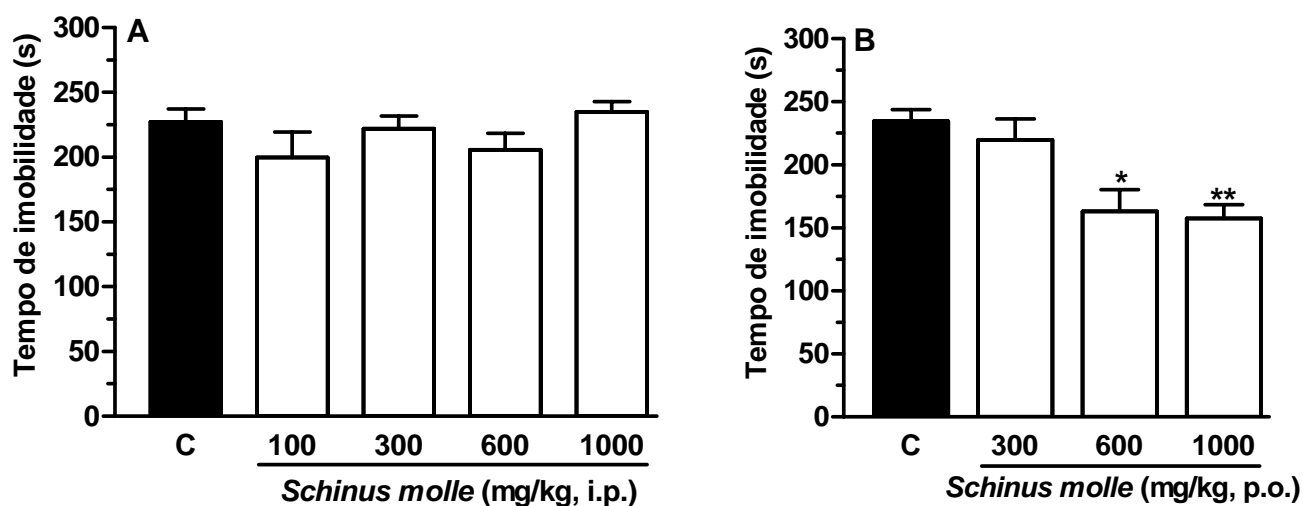


Figura 12. Efeito do tratamento com extrato etanólico de *Schinus molle* L. por via i.p. (A) e por via oral (B) no TSC. Cada coluna representa a média + EPM (N=5-8). * $P<0,05$, ** $P<0,01$ quando comparado com o grupo controle (C).

5.3. A avaliação do efeito do extrato etanólico de *Schinus molle* no teste do campo aberto (TCA)

Os resultados apresentados na Figura 13 mostram a atividade locomotora dos animais tratados com extrato etanólico de *Schinus molle* nas doses de 600 e 1000 mg/kg, p.o. no TCA. A ANOVA de uma via revelou um efeito significativo do tratamento [$F(2,13)=5,57$, $P<0,05$]. O teste *post hoc* mostrou que o extrato etanólico de *Schinus molle* (600 e 1000 mg/kg, p.o.) reduziu significativamente a atividade locomotora dos animais no teste do campo aberto quando comparado ao grupo controle.

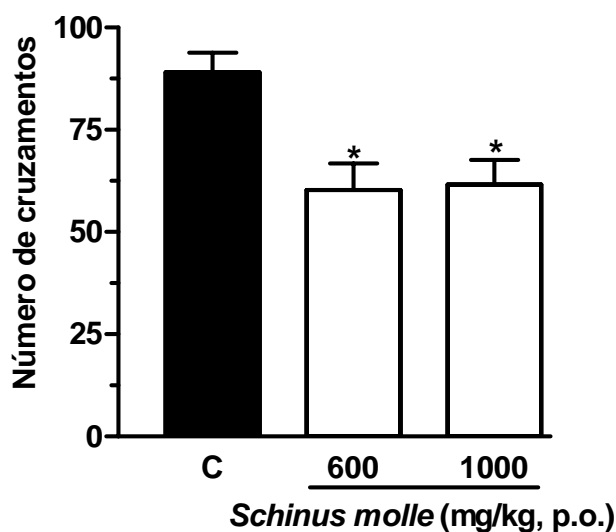


Figura 13. Efeito do tratamento com extrato etanólico de *Schinus molle* (600-1000 mg/kg, p.o.) sobre o número de cruzamentos no teste do campo aberto ($n=5-8$). * $P<0,05$ quando comparado com o grupo controle (C).

5.4. A avaliação do efeito antidepressivo do extrato hexânico de *Schinus molle* e da fluoxetina no TSC

Os resultados da Figura 14 mostram o efeito do tratamento dos animais com o extrato hexânico das folhas de *Schinus molle* (30-600 mg/kg, p.o., A) e fluoxetina (5-10 mg/kg, p.o., B) no TSC. A ANOVA de uma via revelou um efeito significativo do tratamento [$F(4,25)=11,14$, $P<0,01$] e [$F(2,18)=8,15$, $P<0,01$], respectivamente. O efeito antidepressivo do extrato hexânico de *Schinus molle* foi semelhante ao antidepressivo clássico fluoxetina. O teste *post-hoc* mostrou uma redução significativa no tempo de imobilidade no TSC nos animais tratados com o extrato hexânico de *Schinus molle* (30-600 mg/kg, p.o.) e com a fluoxetina (10 mg/kg, p.o.).

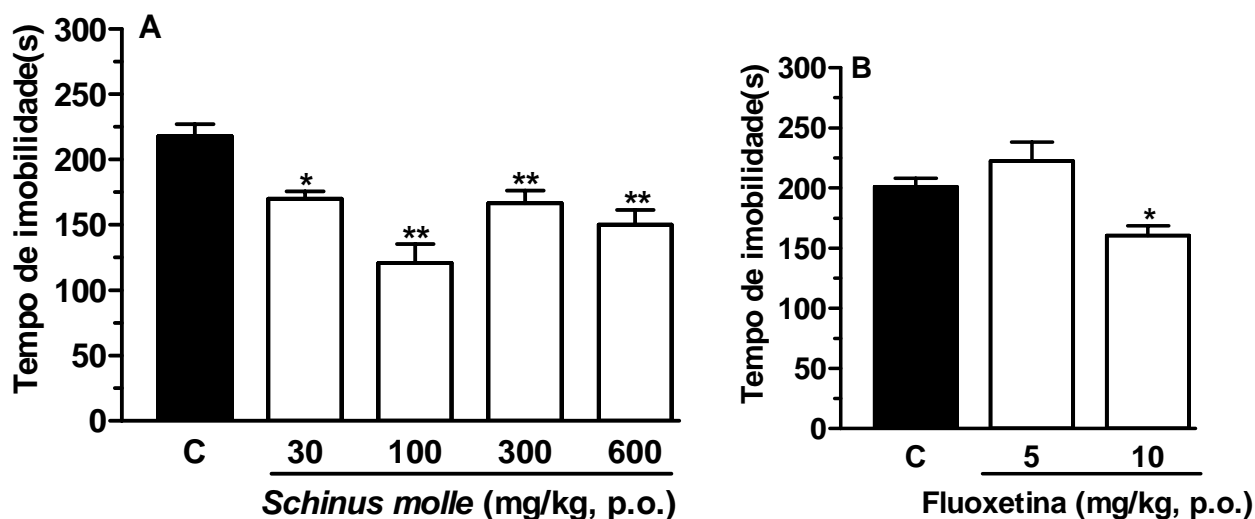


Figura 14. Efeito do tratamento com extrato hexânico de *Schinus molle* (A) ou fluoxetina (B) por via oral sobre o tempo de imobilidade no TSC. Cada coluna representa a média + EPM (N=6-7). *P<0,05 e ** P<0,01 quando comparado com o grupo controle (C).

5.5. A avaliação do efeito do extrato hexânico de *Schinus molle* no teste do campo aberto

A Figura 15 mostra que nas mesmas condições experimentais o tratamento dos animais com extrato hexânico de *Schinus molle* (100-600 mg/kg, p.o.) não alterou significativamente a atividade locomotora dos animais, avaliada pelo TCA, quando comparado ao grupo controle. A ANOVA de uma via não revelou um efeito significativo do tratamento [$F(3,18)=1,38$, $P=0,27$].

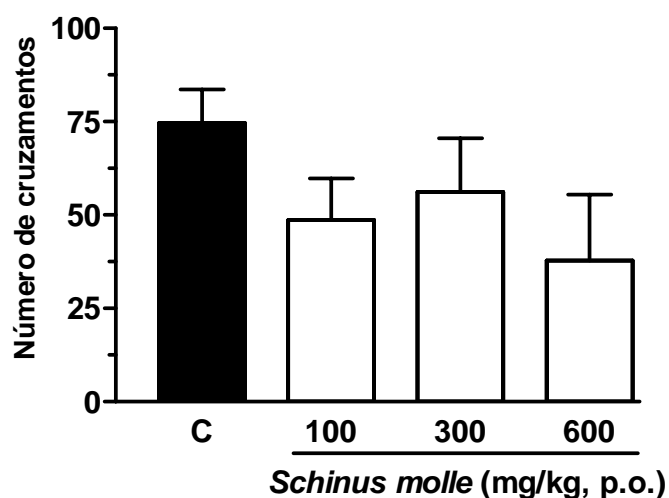


Figura 15. Efeito do tratamento com extrato hexânico de *Schinus molle* L. nas doses de 100-600 mg/kg, p.o. na atividade locomotora dos animais (número de cruzamentos) no campo aberto (N=5-6).

5.6. Investigação do mecanismo de ação antidepressiva do extrato hexânico de *Schinus molle* no TSC

Tendo em vista que o extrato hexânico de *Schinus molle* administrado por via oral apresentou um efeito antidepressivo no TSC em doses mais baixas em relação ao extrato etanólico desta planta, o estudo de mecanismo de ação antidepressiva foi realizado em camundongos tratados com o extrato hexânico na dose de 100 mg/kg, p.o. (dose que produziu uma redução mais significativa do tempo de imobilidade no TSC).

I. Envolvimento do sistema serotoninérgico

Os resultados apresentados na Figura 16A mostram que o pré-tratamento dos animais, uma vez ao dia, por quatro dias consecutivos, com PCPA (100 mg/kg, i.p., inibidor da síntese de serotonina) reverteu significativamente o efeito antidepressivo do extrato hexânico de *Schinus molle* (100 mg/kg, p.o.) no TSC. A ANOVA de duas vias revelou um efeito significativo do tratamento [$F(1,26)=7,47$, $P<0,01$], da interação [$F(1,26)=19,55$, $P<0,01$], mas não do pré-tratamento [$F(1,26)=2,39$, $P=0,13$].

A Figura 16B mostra que o pré-tratamento dos animais com NAN-190 (0,5 mg/kg, i.p., antagonista de receptores 5-HT_{1A}) também foi capaz de reverter a redução do tempo de imobilidade causada pelo extrato hexânico de *Schinus molle* (100 mg/kg, p.o.) no TSC. A ANOVA de duas vias revelou um efeito significativo do tratamento [$F(1,20)=14,56$, $P<0,01$], do pré-tratamento [$F(1,20)=11,67$, $P<0,01$] e da interação [$F(1,20)=10,57$, $P<0,01$].

A Figura 16 C mostra que o pré-tratamento dos animais com WAY100635 (0,1 mg/kg, s.c., antagonista seletivo de receptores 5-HT_{1A}) foi capaz de reverter a redução do tempo de imobilidade causada pelo extrato hexânico de *Schinus molle* (100 mg/kg, p.o.) no TSC. A ANOVA de duas vias revelou um efeito significativo do tratamento [F(1,23)=9,49, P<0,01], do pré-tratamento [F(1,23)=10,24, P<0,01] e da interação [F(1,23)=16,20, P<0,01].

O resultado apresentado na Figura 16D mostra que o pré-tratamento dos camundongos com cetanserina (5 mg/kg, i.p., antagonista de receptores 5-HT_{2A}) foi capaz de reverter a redução do tempo de imobilidade causada pelo extrato hexânico de *Schinus molle* (100 mg/kg, p.o.) no TSC. A ANOVA de duas vias revelou um efeito significativo do tratamento [F(1,19)=10,65, P<0,01], do pré-tratamento [F(1,19)=12,58, P<0,01] e da interação [F(1,19)=9,35, P<0,01].

A Figura 16E mostra que o pré-tratamento dos animais com MDL72222 (0,1 mg/kg, i.p., antagonista de receptores 5-HT₃) foi capaz de reverter a redução do tempo de imobilidade causada pelo extrato hexânico de *Schinus molle* (100 mg/kg, p.o.) no TSC. A ANOVA de duas vias revelou um efeito significativo do pré-tratamento [F(1,30)=6,09, P<0,01] e da interação [F(1,30)=12,02, P<0,01], mas não do tratamento [F(1,30)=2,52, P=0,12].

O teste *post-hoc* mostrou que o pré-tratamento dos animais com NAN-190, WAY100635, cetanserina ou MDL 72222 reverteu o efeito antidepressivo do extrato hexânico de *Schinus molle*. Este resultado indica, desta forma, a participação dos receptores 5HT_{1A}, 5HT_{2A} e 5HT₃ no efeito antidepressivo desta planta.

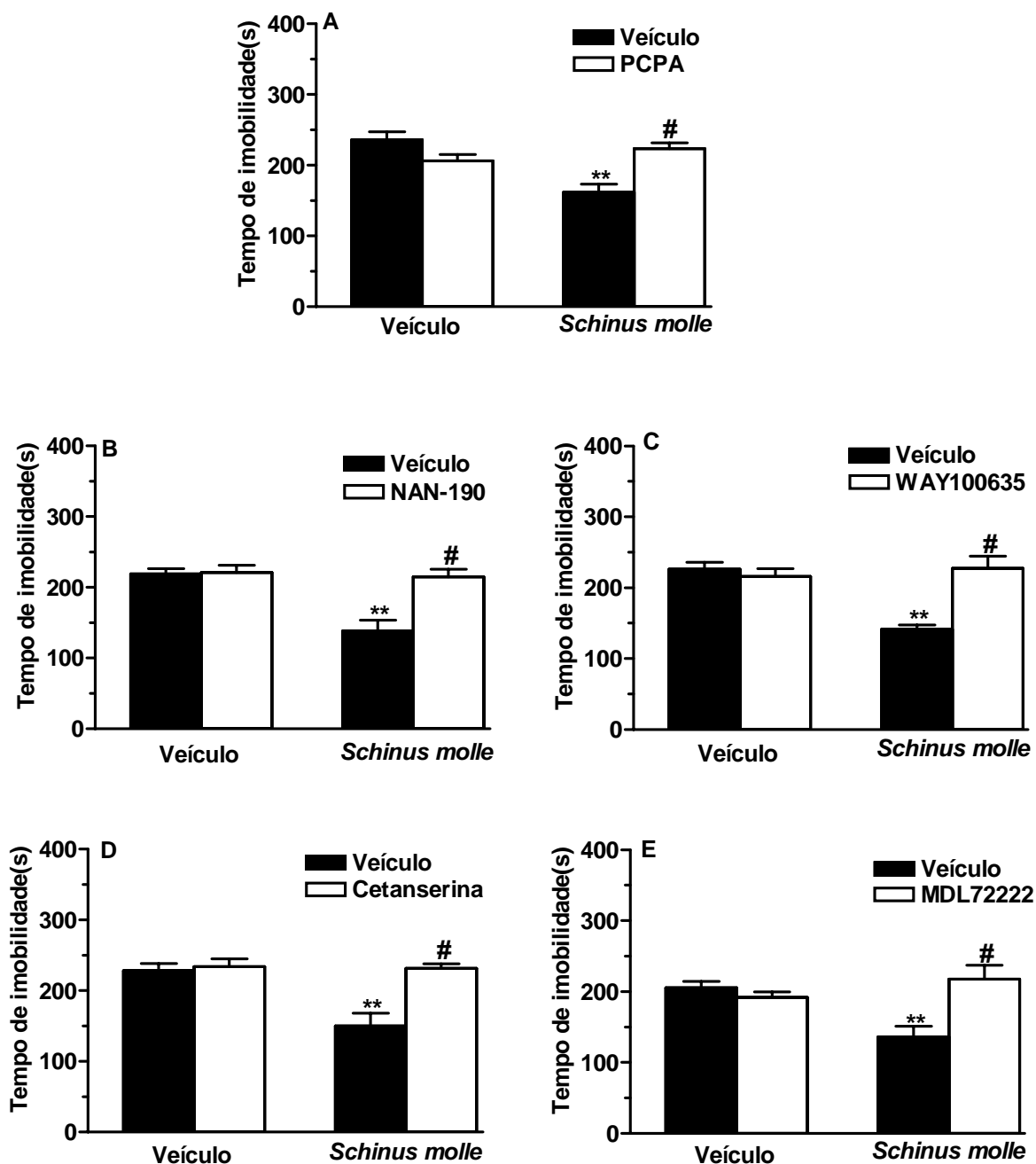


Figura 16. Efeito do pré-tratamento com PCPA (100 mg/kg, i.p., 4 dias, painel **A**), NAN-190 (0,5 mg/kg, i.p., painel **B**), WAY100635 (0,1 mg/kg, s.c., painel **C**), cetanserina (5 mg/kg, i.p., painel **D**) ou MDL72222 (0,1 mg/kg, i.p., painel **E**) na redução do tempo de imobilidade causada pela administração do extrato hexânico de *Schinus molle* (100 mg/kg, p.o.) no TSC. Os valores estão expressos com média + E.P.M. (N=6-9). **P<0,01 quando comparado aos animais tratados com veículo. #P<0,01 em relação ao mesmo grupo pré-tratado com veículo.

II. Envolvimento do sistema noradrenérgico

O resultado apresentado na Figura 17A mostra que o pré-tratamento dos animais com prazosim (1 mg/kg, i.p, antagonista de receptores α_1 -adrenérgicos) preveniu completamente a redução do tempo de imobilidade causada pela administração do extrato de *Schinus molle* (100 mg/kg, i.p.) no TSC. A ANOVA de duas vias revelou um efeito significativo do tratamento [F(1,22)=7,09, P<0,05], do pré-tratamento [F(1,22)=20,94, P<0,01] e da interação [F(1,22)=5,75, P<0,05].

A Figura 17B mostra que o pré-tratamento dos animais com ioimbina (1 mg/kg, i.p., antagonista de receptores α_2 -adrenérgicos) também preveniu o efeito antidepressivo do extrato de *Schinus molle* (100 mg/kg, p.o.) no TST. A ANOVA de duas vias revelou um efeito significativo do tratamento [F(1,23)=5,85, P<0,05], da interação [F(1,23)=8,87, P<0,01], mas não do pré-tratamento [F(1,23)=1,97, P=0,17].

O teste *post-hoc* mostrou que o pré-tratamento dos animais com prazosim e ioimbina reverteu o comportamento tipo antidepressivo dos animais tratados com o extrato hexânico de *Schinus molle*. Este resultado indica, portanto, a participação dos receptores α_1 -adrenérgicos e α_2 -adrenérgicos neste efeito antidepressivo.

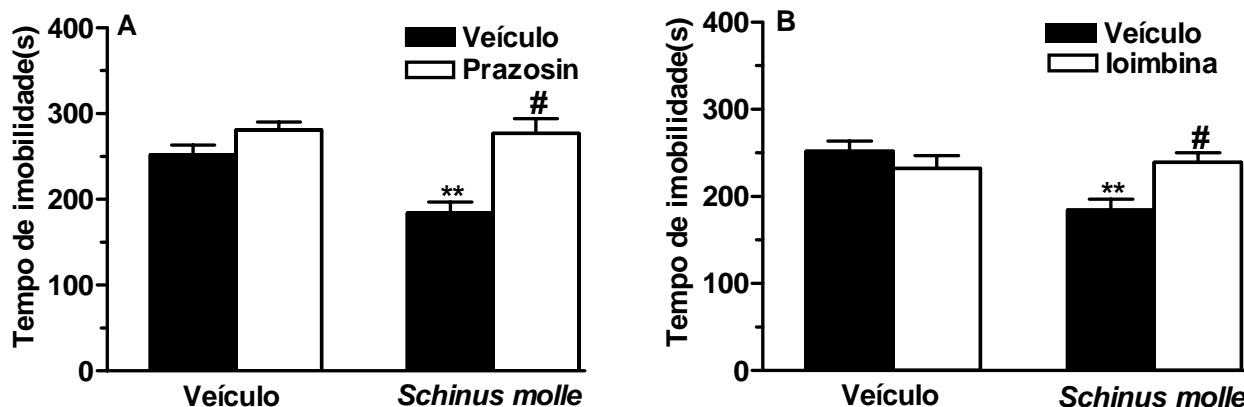


Figura 17. Efeito do pré-tratamento dos animais com prazosim (1 mg/kg, i.p., painel **A**) e ioimbina (1 mg/kg, i.p., painel **B**) na redução do tempo de imobilidade causada pela administração do extrato de *Schinus molle* (100 mg/kg, p.o.) no TSC. Os valores estão expressos com média + E.P.M. (N=6-8). **P<0,01 quando comparado aos animais tratados com veículo. #P<0,01 em relação ao mesmo grupo pré-tratado com veículo.

III. Envolvimento do sistema dopaminérgico

Os resultados da Figura 18A mostram que o efeito anti-imobilidade do extrato de *Schinus molle* (100 mg/kg, p.o.) foi completamente prevenido pelo pré-tratamento dos animais com SCH23390 (0,05 mg/kg, s.c.). A ANOVA de duas vias revelou um efeito significativo do tratamento [F(1,36)=22,36, P<0,01] e da interação [F(1,36)=15,32, P<0,01], mas não do pré-tratamento [F(1,36)=1,88, P=0,17]. A Figura 18B mostra que o pré-tratamento dos animais com sulpirida (50 mg/kg, i.p.) também foi capaz de reverter o efeito antidepressivo do extrato de *Schinus molle* (100 mg/kg, p.o.) no TSC. A ANOVA de duas vias revelou um efeito significativo do pré-tratamento [F(1,37)=8,75, P<0,01], do tratamento [F(1,37)=32,59, P<0,01] e da interação [F(1,37)=5,01, P<0,05].

O teste *post-hoc* revelou que os animais tratados com o extrato hexânico de *Schinus molle* e pré-tratados com SCH23390 e sulpirida apresentaram um tempo de imobilidade similar ao dos animais do grupo controle e significativamente diferente dos animais tratados com o extrato hexânico e pré-tratados com veículo. Estes resultados indicam a participação dos receptores D₁ e D₂ no efeito do extrato hexânico de *Schinus molle* no TSC.

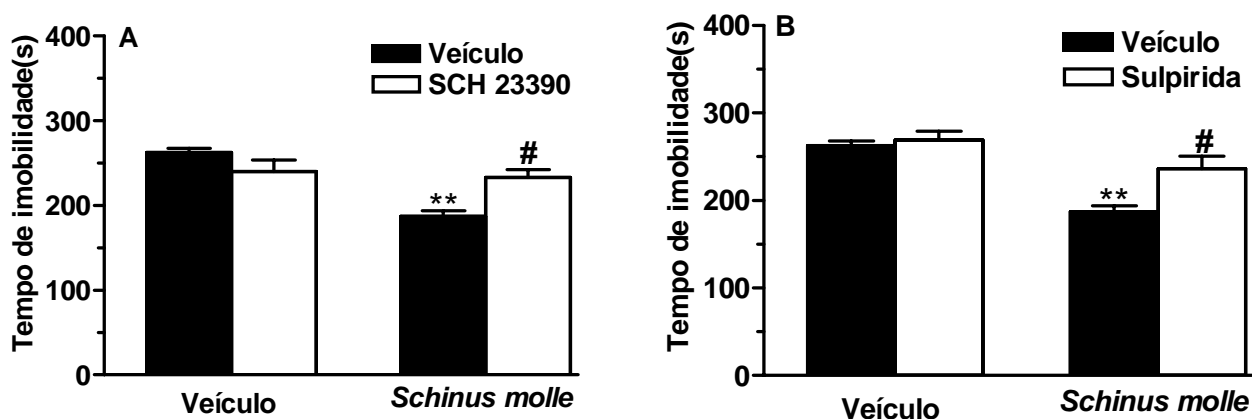


Figura 18. Efeito do pré-tratamento dos animais com SCH 23390 (0,05 mg/kg, s.c., painel **A**) ou sulpirida (50 mg/kg, i.p., painel **B**) na redução do tempo de imobilidade causada pela administração do extrato hexânico de *S. molle* (100 mg/kg, p.o.) no TSC. Os valores estão expressos com média + E.P.M. (N=9-12). **P<0,01 quando comparado aos animais tratados com veículo. #P<0,01 em relação ao mesmo grupo pré-tratado com veículo.

5.7. Investigação do potencial antidepressivo dos constituintes isolados dos extratos etanólico e hexânico de *Schinus molle* no TSC

Com o objetivo de investigar se os constituintes isolados dos extratos etanólico (rutina) e do extrato hexânico (mistura de ésteres de ácidos graxos, mistura de álcoois graxos e mistura de triterpenos) de *Schinus molle* são responsáveis pela ação antidepressiva observada com os extratos desta planta, testamos o efeito dos mesmos no TSC.

Os resultados da Figura 19 mostram o efeito do tratamento dos animais com a rutina e a Figura 20 A-C refere-se ao efeito dos compostos isolados do extrato hexânico sobre o tempo de imobilidade dos animais no TSC. A ANOVA de uma via não revelou um efeito significativo do tratamento dos animais com a fração II (33-34) constituída por uma mistura de álcoois graxos [$F(3,27)=1,941$, $P=0,15$] e com a fração III (43-45) constituída por uma mistura de triterpenos [$F(4,42)=0,416$, $P=0,42$]. Porém, a rutina [$F(5,46)=4,403$, $P<0,01$] e a fração I (6-17) constituída por uma mistura de ésteres de ácidos graxos [$F(5,37)=5,619$, $P<0,01$] diminuíram significativamente o tempo de imobilidade dos animais no TSC. O teste *post-hoc* mostrou que o tratamento dos animais com a rutina (1 mg/kg, p.o) e a mistura de ésteres de ácidos graxos (10 mg/kg, p.o) reduziu significativamente o tempo de imobilidade dos animais no TSC.

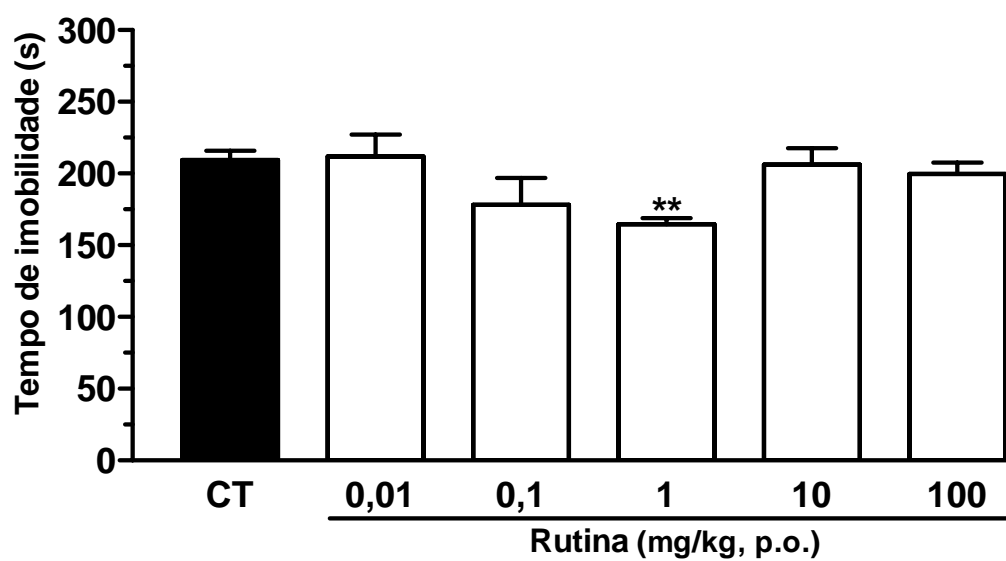


Figura 19. Efeito do tratamento por via oral com a rutina, flavonóide isolado do extrato etanólico de *Schinus molle* sobre o tempo de imobilidade no TSC. Cada coluna representa a média + EPM (N=6-12).

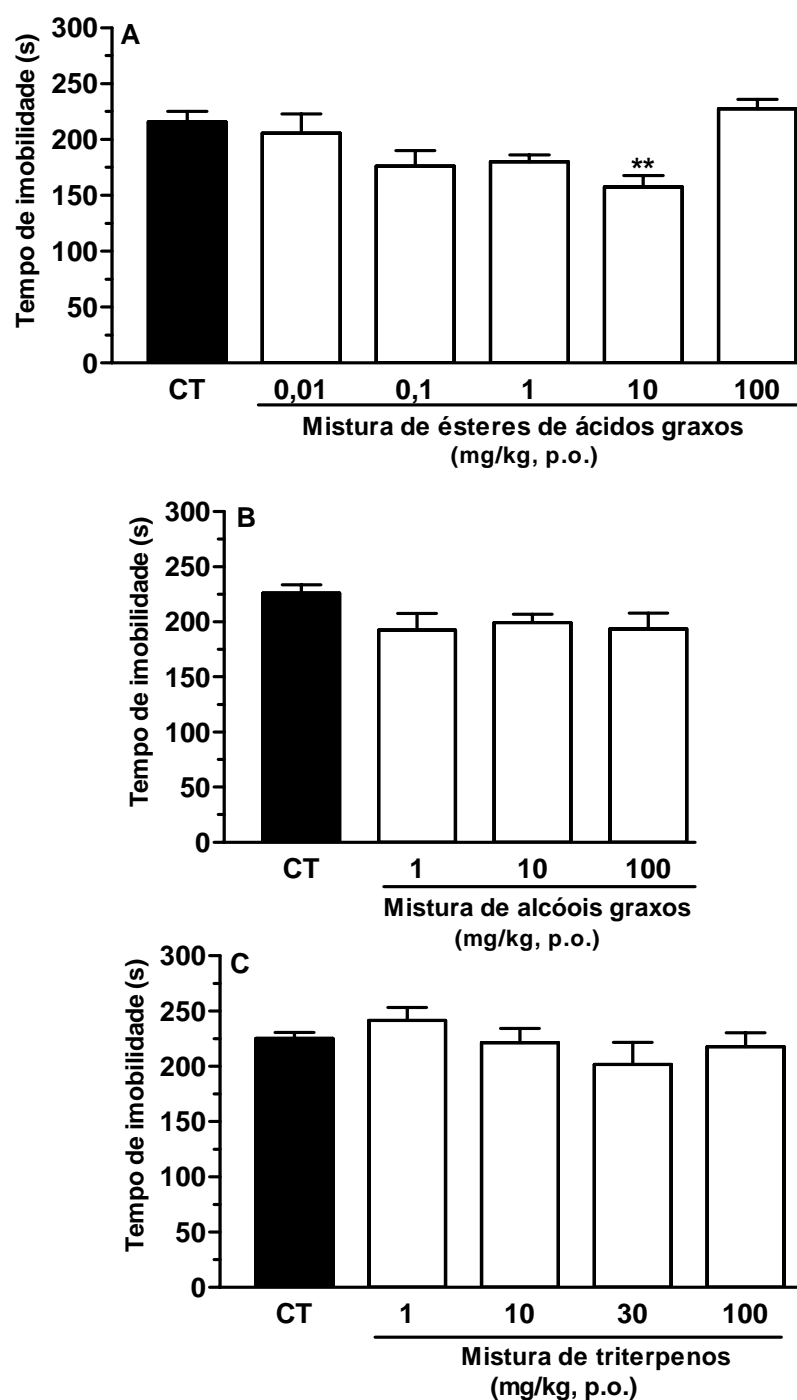


Figura 20. Efeito do tratamento por via oral com a mistura de ésteres de ácidos graxos (A), mistura de álcoois graxos (B) e mistura de triterpenos (C) obtidos a partir do extrato hexânico de *Schinus molle* sobre o tempo de imobilidade no TSC. Cada coluna representa a média + EPM (N=6-12).

5.8. A avaliação dos constituintes isolados dos extratos etanólico e hexânico de *Schinus molle* no teste do campo aberto

As Figuras 21 e 22 mostram que nas mesmas condições experimentais o tratamento dos animais com a rutina (0,1-1mg/kg, p.o.) e mistura de ésteres de ácidos graxos (0,01-10 mg/kg, p.o.), respectivamente não alteraram a atividade locomotora dos mesmos no teste do campo aberto, quando comparado ao grupo controle. A ANOVA de uma via não revelou um efeito significativo dos tratamentos com rutina [$F(2,14)=0,092$, $P=0,91$] e com a mistura de ésteres de ácidos graxos [$F(4,24)=0,471$, $P=0,75$].

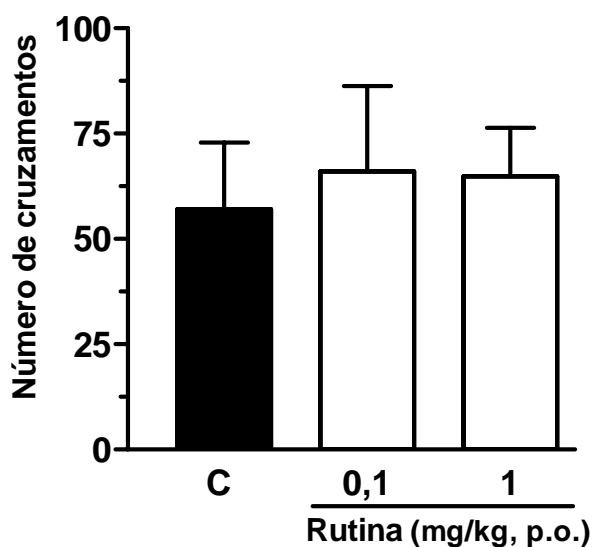


Figura 21. Efeito do tratamento por via oral com a rutina, flavonóide isolado obtido a partir do extrato etanólico de *Schinus molle* nas doses de 0,1-1 mg/kg, p.o. na atividade locomotora dos animais (número de cruzamentos) no teste do campo aberto (N=5-8).

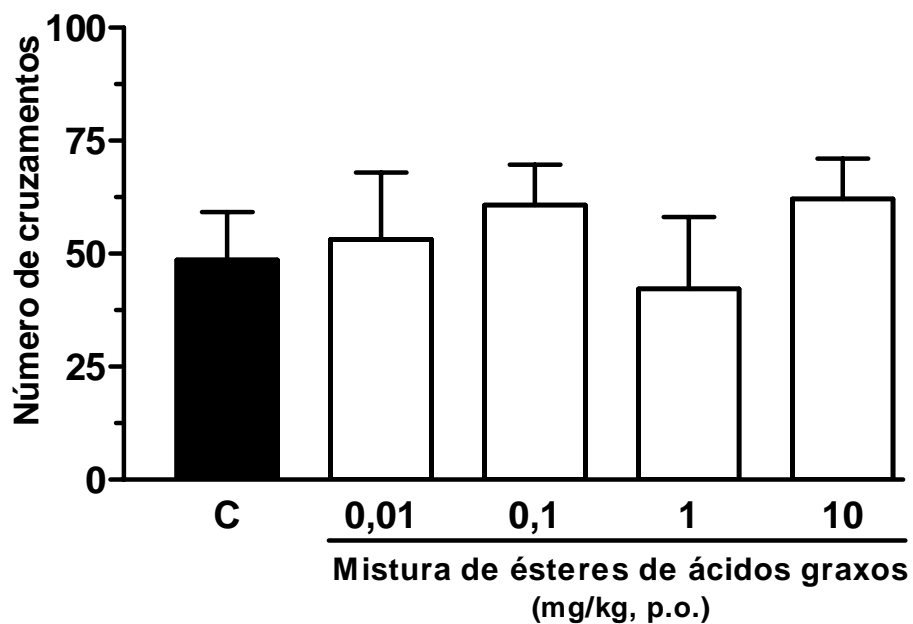


Figura 22. Efeito do tratamento por via oral com a mistura de ésteres de ácidos graxos a partir do extrato hexânico de *Schinus molle* nas doses de 0,01-10mg/kg, p.o. na atividade locomotora dos animais (número de cruzamentos) no teste do campo aberto (N=5-8).

6. Discussão

O principal objetivo deste estudo foi investigar o potencial antidepressivo da *Schinus molle* e os mecanismos de ação responsáveis por seu efeito antidepressivo no TSC. Para atingir este objetivo, inicialmente foi realizado um “screening”, no qual foram selecionados o extrato da planta, a via de administração e o teste comportamental que melhor ilustrassem o potencial antidepressivo da *Schinus molle*, para posterior investigação do mecanismo de ação.

Tendo em vista que o extrato hexânico de *Schinus molle* administrado por via oral apresentou um efeito antidepressivo no TSC em doses mais baixas em relação ao extrato etanólico desta planta, o

estudo de mecanismo de ação antidepressiva foi realizado em camundongos tratados com o extrato hexânico na dose de 100 mg/kg, p.o. (dose que produziu uma redução mais significativa do tempo de imobilidade no TSC).

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

No presente estudo foi observado que o extrato etanólico de *Schinus molle* não foi efetivo em reduzir o tempo de imobilidade dos animais no TNF. Por outro lado, a administração oral deste extrato produziu efeito antidepressivo no TSC. Contudo, as doses que causaram redução do tempo de imobilidade dos animais no TSC, produziram também diminuição da atividade locomotora dos animais no TCA, o que indica que o efeito antidepressivo do extrato pode estar sendo subestimado.

A administração oral do extrato hexânico de *Schinus molle*, nas mesmas doses que causaram redução no tempo de imobilidade dos animais no TSC, não produziu alterações significativas na atividade locomotora dos animais no TCA. Assim, podemos evidenciar que a administração do extrato

desta planta produz um efeito antidepressivo específico neste teste. Além disso, a administração do extrato hexânico de *Schinus molle* apresentou um efeito similar ao produzido pela fluoxetina, um inibidor seletivo da recaptação de serotonina, utilizada como controle positivo.

O presente estudo também analisou alguns mecanismos que poderiam estar relacionados aos efeitos produzidos pela administração do extrato hexânico de *Schinus molle* no TSC, visto que este extrato foi o que produziu ação antidepressiva em doses mais baixas. Tendo em vista que o sistema monoaminérgico é um dos alvos mais importantes na patofisiologia e tratamento da depressão (Elhwuegi, 2004; Millan, 2004), investigamos o envolvimento dos sistemas serotoninérgico, noradrenérgico e dopaminérgico no efeito antidepressivo deste extrato de *Schinus molle* no TSC. Para atingir este objetivo, foi avaliada a possível reversão do efeito anti-imobilidade do extrato hexânico de *Schinus molle* (100 mg/kg, p.o., 1 h) pelo pré-tratamento dos camundongos com vários antagonistas farmacológicos de receptores serotoninérgicos, noradrenérgicos e dopaminérgicos.

A depressão tem sido amplamente associada a alterações na atividade serotoninérgica no cérebro. Além disso, o sistema serotoninérgico desempenha um papel fundamental no mecanismo de ação de fármacos antidepressivos (Millan, 2004). O envolvimento do sistema serotoninérgico na ação antidepressiva do extrato hexânico de *Schinus molle* no TSC foi investigado através da utilização do inibidor da síntese de serotonina, PCPA e de antagonistas serotoninérgicos específicos. Nossos resultados indicam que o sistema serotoninérgico está envolvido no efeito antidepressivo do extrato de *Schinus molle*, visto que o pré-tratamento dos animais com PCPA, e com os antagonistas 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A} e 5-HT₃, WAY 100635, cetanserina e MDL 72222, respectivamente foi capaz de prevenir completamente seu efeito no TSC.

O PCPA, um inibidor da enzima triptofano hidroxilase, administrado por quatro dias consecutivos é capaz de depletar cerca de 60% das reservas endógenas de serotonina em camundongos sem, contudo, afetar os níveis de noradrenalina e dopamina (Redrobe et al., 1998 a,b). Além disso, nosso

grupo demonstrou que o mesmo tratamento com PCPA foi capaz de reverter completamente o efeito antidepressivo da fluoxetina sem alterar o efeito da imipramina no TSC (Rodrigues et al., 2002).

Alguns estudos têm demonstrado o envolvimento dos receptores 5-HT_{1A} no mecanismo de ação das várias classes de drogas antidepressivas, incluindo os tricíclicos, os ISRS (inibidores seletivos da recaptação de serotonina) e IMAO (inibidores da MAO) (Hensler, 2002). Uma evidência do envolvimento dos receptores 5-HT_{1A} no efeito antidepressivo do extrato hexânico de *Schinus molle* foi a reversão do efeito de anti-imobilidade do extrato no TSC pelo antagonista seletivo dos receptores 5-HT_{1A}, WAY 100635.

O papel dos receptores 5-HT₂ na ação de vários antidepressivos tem sido mostrado. Muitos antidepressivos são antagonistas de receptores 5-HT₂ e apresentam a habilidade de diminuir a ligação da serotonina aos receptores 5-HT₂ após administração prolongada. Sugere-se que a “down-regulation” de receptores 5-HT_{2A} possa mediar as ações a longo prazo dos antidepressivos (Deakin, 1988). No presente trabalho, o pré-tratamento dos animais com cetanserina foi capaz de reverter o efeito antidepressivo do extrato hexânico de *Schinus molle* no TSC, evidenciando a participação dos receptores 5-HT₂ neste efeito. Resultado similar foi apresentado por nosso grupo em estudos prévios nos quais a cetanserina foi eficaz em reverter o efeito antidepressivo da agmatina (Zomkowski et al., 2004) e da lectina da *Canavalia brasiliensis* (Barauna et al., 2006) em camundongos no TNF. Além disso, foi mostrado que o agonista preferencial de receptores 5HT_{2A}, DOI, aumenta o efeito antidepressivo de vários compostos (Zomkowski et al., 2004; Khisti e Chopde, 2000). Portanto, o presente estudo indica que o efeito antidepressivo do extrato hexânico de *Schinus molle* parece ser mediado pela estimulação dos receptores 5-HT_{2A}.

A participação dos receptores 5-HT₃ no efeito antidepressivo do extrato hexânico de *Schinus molle* também foi investigada. O pré-tratamento dos animais com MDL 72222 também foi capaz de prevenir o efeito anti-imobilidade do extrato no TSC, demonstrando que este efeito é mediado, pelo menos em parte, pela interação com este subtipo de receptor serotoninérgico. O envolvimento dos

receptores 5HT₃ na patofisiologia da depressão é menos estudado quando comparado aos receptores 5-HT_{1A} e 5-HT₂. No entanto, dados na literatura demonstram que diferentes classes de antidepressivos agem como antagonistas funcionais de receptores 5-HT₃, indicando que a supressão da atividade do receptor 5-HT₃ pode contribuir para a ação dos antidepressivos (Eisensamer et al., 2003). Além disso, recentes estudos demonstraram que o MDL 72222 administrado na dose de 3 mg/kg, i.p. em camundongos, a qual é mais alta quando comparada à dose utilizada no presente estudo, produziu um efeito antidepressivo no TSC (Kos et al., 2006). Embora a aparente inconsistência com os estudos relatados, a reversão do efeito antidepressivo do extrato hexânico de *Schinus molle* pelo MDL 72222 sugere que seu efeito antidepressivo seja mediado pela ativação dos receptores 5-HT₃. Em concordância com esta hipótese, a terapia eletroconvulsiva que é utilizada para tratamento de depressão resistente a antidepressivos, foi capaz de potencializar a função dos receptores 5-HT₃ no hipocampo (Ishihara e Sasa, 2001).

O papel da noradrenalina na patofisiologia da depressão tem sido também extensivamente estudado, visto que alguns antidepressivos aumentam os níveis de noradrenalina na fenda sináptica e alguns destes fármacos também agem diretamente nos receptores noradrenérgicos (Elhwuegi, 2004). Além disso, foi demonstrado recentemente que camundongos deficientes de noradrenalina não respondem aos antidepressivos, incluindo os ISRS (Cryan et al., 2004). Em nosso estudo tanto o prazosim (antagonista α_1 -adrenérgico) como a ioimbina (antagonista α_2 -adrenérgico) foram capazes de reverter o efeito antidepressivo do extrato de *Schinus molle* no TSC. Este resultado indica que o extrato pode exercer este efeito no TSC por interagir com os receptores α_1 e α_2 adrenérgicos, o que está de acordo com a bem relatada participação dos receptores α_1 e α_2 adrenérgicos na ação dos agentes antidepressivos (Millan, 2004).

O sistema dopaminérgico também está bastante implicado na regulação do humor (Dailly et al., 2004). Algumas evidências bioquímicas originadas de estudos clínicos mostraram que os níveis plasmáticos do ácido homovanílico e do ácido 3,4-dihidroxifenilacético, dois metabólitos da dopamina,

estavam significativamente diminuídos em pacientes deprimidos, indicando uma diminuição no “turnover” da dopamina (Mitani et al., 2006; Sher et al., 2006). Tem sido considerado que a potencialização da neurotransmissão dopaminérgica induzida pelo tratamento crônico com antidepressivos pode contribuir para seu efeito terapêutico (D’Aquila et al., 2000). Também há várias evidências farmacológicas a cerca da eficácia dos antidepressivos com efeitos dopaminérgicos no tratamento da depressão (Papakostas, 2006). Como demonstramos nossos resultados o antagonista seletivo dos receptores dopaminérgicos D₁, o SCH 23390, e o antagonista dos receptores dopaminérgicos D₂, a sulpirida, reverteram de forma significativa o efeito anti-imobilidade do extrato hexânico de *Schinus molle* no TSC. Desta forma, os nossos resultados estão de acordo com dados da literatura que indicam que tanto os receptores D₁ como os receptores D₂ desempenham um papel importante na modulação dos estados de humor.

Um estudo de Yamada et al. (2004) sugere que os receptores D₁ e D₂ estão envolvidos nos efeitos dos inibidores da recaptção de dopamina no TNF. Além disso, foi demonstrado que o agonista do receptor de dopamina D₁, o SKF 38393 aumenta os efeitos anti-imobilidade dos ISRSs, sugerindo que o receptor D₁ pode estar contribuindo para a eficácia destes fármacos (Renard et al., 2001). Foi também demonstrado que os efeitos anti-imobilidade do antidepressivo tricíclico imipramina no TNF em ratos foi reduzido pela administração de um oligonucleotídeo antisense para receptores dopaminérgicos D₂ (Dziedzicka-Wasylewska et al., 2000). Além disso, em estudos clínicos, foi demonstrado que agonistas de receptores D₂ dopaminérgicos são efetivos no tratamento de pacientes com depressão (Wahrens e Gerlach, 1981).

Em resumo, os resultados do presente estudo indicaram que a administração oral do extrato hexânico de *Schinus molle* apresenta um efeito antidepressivo específico e de maior eficácia que o extrato etanólico de *Schinus molle* no TSC. Além disso, este efeito não é devido a um efeito psicoestimulante e parece ser mediado por uma interação com o sistema monoaminérgico. É interessante

ressaltar que foi relatado na literatura uma baixa toxicidade do extrato obtido das folhas de *Schinus molle* (Barrachina et al., 1997).

Estudos fitoquímicos têm identificado os componentes ativos da *Schinus molle* tais como taninos, triterpenos, flavonóides e saponinas (Pozzo-Balbi et al., 1978; Olafsson et al., 1996; Yueqin et al., 2003; Taylor, 2005b; Salem et al., 2006). No entanto, uma caracterização preliminar do extrato hexânico de *Schinus molle* utilizado no presente estudo não demonstrou a presença de flavonóides e taninos. Este extrato possui triterpenos como compostos majoritários. Porém, as frações 33-34 composta por uma mistura de álcoois graxos e 43-45, composta por uma mistura de triterpenos isoladas do extrato hexânico não alteraram o tempo de imobilidade dos animais no TSC. Desta forma, estes componentes parecem não ser responsáveis pelo efeito anti-imobilidade do extrato hexânico no TSC. Por outro lado, a fração 6-17 isolada do extrato hexânico, a qual corresponde a uma mistura de ésteres de ácidos graxos (10 mg/kg, p.o) causou um efeito antidepressivo no TSC. Uma possibilidade é que o este efeito seja devido à presença de ésteres de ácido linoléico. Esta hipótese baseia-se no fato de haver relatos da presença deste composto na planta (Taylor, 2005b), bem como da atividade antidepressiva produzida por este ácido no TNF ter sido relatada na literatura (Huang, et al., 2006).

Dados na literatura demonstram que a fração hexano/diclorometano (75/25) de *Schinus molle* foi capaz de reduzir significativamente o número de contorções abdominais induzido pelo ácido acético (i.p.) em camundongos, indicando o potencial antinociceptivo desta fração (Barrachina et al., 1997). Considerando que vários compostos que apresentam ação antinociceptiva são também dotados de ação antidepressiva (Cohen e Abdi, 2001; Rojas-Corrales, et al., 2003; Aoki et al., 2006; Micó, et al., 2006; Adebiyi et al., 2006), este resultado pode indicar que o extrato hexânico usado no presente estudo também possua ação antinociceptiva.

Em relação ao extrato etanólico de *Schinus molle*, podemos especular que pelo menos parte do seu efeito antidepressivo observado no presente estudo seja devido à presença do flavonóide rutina, o qual foi eficaz em reduzir o tempo de imobilidade dos animais no TSC. Este resultado é consistente com

o relato de efeito antidepressivo produzido pela rutina, assim como a hiperforina, constituintes isolados do *Hipericum perforatum* Linn (Erva de São João) no TSC e TNF (Butterweck et al., 2000, 2003a; 2003b; Noldner e Schotz, 2002).

7. Conclusões

Em conclusão, o presente estudo fornece a primeira evidência que os extratos etanólico e hexânico de *Schinus molle* produzem um efeito antidepressivo específico no modelo animal preditivo de atividade antidepressiva, o TSC, similar ao resultado produzido pelo antidepressivo clássico fluoxetina. Além disso, nós demonstramos que este efeito é dependente da interação com os sistemas serotoninérgico (receptores 5HT_{1A}, 5HT_{2A} e 5HT₃), noradrenérgico (receptores α_1 e α_2) e dopaminérgico (receptores D₁ e D₂). Portanto, nossos resultados sugerem que o extrato hexânico de *Schinus molle* compartilha efeitos farmacológicos com vários antidepressivos convencionais, pelo menos a nível pré-clínico e que os compostos isolados rutina (extrato etanólico) e a mistura de ésteres de ácidos graxos (extrato hexânico) participam dos efeitos antidepressivo de *Schinus molle*.

8. Referências Bibliográficas

- ADEBIYI, R.A.; ELSA, A.T.; AGAIE, B.M.; ETUK, E.U. Antinociceptive and antidepressant-like effects of *Securidaca longepedunculata* root extract in mice. **J. Ethnopharmacol.**, v.107, p.234-239, 2006.
- AOKI, M.; TSUJI, M.; TAKEDA, H.; HARADA, Y.; NOHARA, J.; MATSUMIYA, T.; CHIBA, H. Antidepressants enhance the antinociceptive effects of carbamazepine in the acetic acid-induced writhing test in mice. **Eur. J. Pharmacol.**, v.550, p.78-83, 2006.
- AMERICAN PSYCHIATRY ASSOCIATION. **Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders**. 4th. ed., 1994.
- BALDESSARINI, R.J. Drugs and the treatment of psychiatric disorders. Em Goodman & Gilman's. **The Pharmacological Basis of Therapeutics**, 1996.
- BARAUNA, S.C.; KASTER, M.P.; HECKERT, B.T.; NASCIMENTO, K.S.; ROSSI, F.M.; TEIXEIRA, E.H.; CAVADA, B.S.; RODRIGUES, A.L.S.; LEAL, R.B. Antidepressant-like effect of lectin from *Canavalia brasiliensis* (ConBr) administered centrally in mice. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v.85, p. 160-169, 2006.
- BARRACHINA, M.D.; BELLO, R.; MARTÍNEZ-CUESTA, M.A.; PRIMO-YÚFERA, E.; ESPLUGES, J. Analgesic and central depressor effects of the dichloromethanol extract from *Schinus molle* L. **Phytother. Res.**, v.11, p.317-319, 1997.
- BELLO, R.; BARRACHINA, M.D.; MORENO, L.; PRIMO-YÚFERA, E.; ESPLUGES, J. Effects on arterial blood pressure of the methanol and dichloromethanol extracts from *Schinus molle* L. in rats. **Phytother. Res.**, v.10, p.634-635, 1996.
- BELLO, R.; BELTRÁN, B.; MORENO, L.; CALATAYUD, S.; PRIMO-YÚFERA, E.; ESPLUGES, J. In vitro pharmacological evaluation of the dichloromethanol extract from *Schinus molle* L. **Phytother. Res.**, v.12, p.523-525, 1998.
- BILIA, A.R.; GALLORI, S.; VINCIERI, F.F. St. John's wort and depression. Efficacy, safety and tolerability-an update. **Life Sci.**, v.70, p.3077-3096, 2002.
- BLACKBURN-MUNRO, G.; BLACKBURN-MUNRO, R.E. Chronic pain, chronic stress and depression: coincidence or consequence? **J. Neuroendocrinol.**, v.13, p.1009-1023, 2001.

BOURIN, M.; CHENU, F.; RIPOLL, N.; DAVID, D.J.P. A proposal of decision tree to screen putative antidepressants using forced swim and tail suspension tests. **Behav. Brain Res.**, v.164, p.266-269, 2005.

BREMMER, J.; NARAYAN, M.; ANDERSON, E.R.; STAIB, L.H.; MILLER, H.; CHARNEY, D.S. Smaller hippocampal volume in major depression. **Am. J. Psychiatry**, v.157, p.115-117, 2000.

BRUNELLO, N.; MENDLEWICZ, J.; KASPER, S.; LEONARD, B.; MONTGOMERY, S.; NELSON, J.C.; PAYKEL, E.; VERSIANI, M.; RACAGNI, G. The role of noradrenaline and selective noradrenaline reuptake inhibition in depression. **Eur. Neuropsychopharmacol.**, v.12, p.461-475, 2002.

BUTTERWECK, V.; JURGENLIEMK, G.; NAHRSTEDT, A.; WINTERHOFF, H. Flavonoids from *Hypericum perforatum* show antidepressant activity in the forced swimming test. **Planta Med.** v.66, p.3-6, 2000.

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.**, v.73, p.627-639, 2003a.

BUTTERWECK, V. Mechanism of Action of St. John's Wort in Depression: What is Known? **CNS Drugs**, v.17, p.539-562, 2003b.

CALIXTO, J.B., Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America a personal view. **J. Ethnopharmacol.**, v.100, p.131-134, 2005.

CARLINI, E.A. Plants and the central nervous system. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v.75, p.501-512, 2003.

CASTRÉN, E. Is mood chemistry? **Nat. Rev. Neurosci.**, v.6, p.241-246, 2005.

CHATTERJEE, S.S.; BHATTACHARYA, S.K.; WONNEMANN, M.; SINGER, A.; MULLER, W.E. Hyperforin as a possible antidepressant component of *Hypericum* extracts. **Life Sci.** v.63, p.499-510, 1998.

COHEN, S.P.; ABDI, S. New developments in the use of tricyclic antidepressants for management of pain. **Curr. Opin. Anaesthesiol.** v.14, p.505-511, 2001.

CRYAN, J.F.; MARKOU, A.; LUCKI, I. Assessing antidepressant activity in rodents: recent developments and future needs. **Trends Pharmacol. Sci.**, v.23, p.238-245, 2002.

CRYAN, J.F.; O'LEARY, O.F.; JIN, S.; FRIEDLAND, J.C.; OUYANG, M.; HIRSCH, B.R.; PAGE, M.; DALVI, A.; THOMAS, S.A.; LUCKI, I. Norepinephrine-deficient mice lack responses to antidepressant drugs, including selective serotonin reuptake inhibitors. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.101, p.8186-8191, 2004.

- CRYAN, J.F.; MOMBÉREAU, C.; VASSOUT, A. The tail suspension test as a model for assessing antidepressant activity: review of pharmacological and genetic studies in mice. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, v.29, p.571-625, 2005.
- CRYAN, J.F.; SLATTERY, D.A. Animal models of mood disorders: recent developments. **Curr Opin Psychiatry**, v.2, p. 1–7, 2007.
- DAILLY, E.; CHENU, F.; RENARD, C.E.; BOURIN, M. Dopamine, depression and antidepressants. **Fundam. Clin. Pharmacol.**, v.18, p.601-607, 2004.
- D'AQUILA, P.S.; COLLU, M.; GESSA, G.L.; SERRA, G. The role of dopamine in the mechanism of action of antidepressants drugs. **Eur. J. Pharmacol.**, v.405, p.365-373, 2000.
- DEAKIN, J.F. 5HT₂ receptors, depression and anxiety. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v.29, p.819-820, 1998.
- DE SMET, P.A. The role of plant-derived drugs and herbal medicines in healthcare. **Drugs**, v.54, p.801-840, 1997.
- DEUSSING, J.M. Animal models of depression. **Drug Discov. Today: Dis. Models.**, v.3, p.375-383, 2006.
- DRANOVSKY, A.; HEN, R. Hippocampal neurogenesis: regulation by stress and antidepressants. **Biol. Psychiatry** v.59, p.1136-1143, 2006.
- D'SA, C.; DUMAN, R.S. Antidepressants and neuroplasticity. **Bipolar Disord.**, v.4, p.183-194, 2002.
- DUMAN, R.; MALBERG, J.; NAKAGAWA, S.; D'AS, C. Neuronal plasticity and survival in mood disorders. **Biol. Psychiatry** v.48, p.732-739, 2000.
- DUMAN, R.S.; MONTEGGIA, L.M. A Neurotrophic Model For Stress-related Mood Disorders. **Biol. Psychiatry** v.59, p.1116-1127, 2006.
- DZIEDZICKA-WASYLEWSKA, M.; KOLASIEWICZ, W.; ROGOZ, Z.; MARGAS, W.; MAJ, J. The role of dopamine D2 receptor in the behavioral effects of imipramine-study with the use of antisense oligonucleotides. **J. Physiol. Pharmacol.**, v.51, p.401-409, 2000.
- EISENSAMER, B.; RAMMES, G.; GIMPL, G.; SHAPA, M.; FERRARI, U.; HAPFELMEIER, G.; BONDY, B.; PARSONS, C.; GILLING, K.; ZIEGLGÄNSBERGER, W.; HOLSBOER, F.; RUPPRECHT, R. Antidepressants are functional antagonists at the serotonin type 3 (5-HT₃) receptor. **Mol. Psychiatry.**, v.8, p.994-1007, 2003.
- ^{ELHWUEGI}, A.S. Central monoamines and their role in major depression. **Prog Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry**, v.28, p.435-451, 2004.
- ERNEST, E. Second thoughts about safety of St John`s wort. **Lancet**, v.354, p.2014-2016, 1999.

FERRERO, A.A.; WERDIN GONZÁLEZ, J.O.; SÁNCHEZ CHOPA, C. Biological activity of *Schinus molle* on *Triatoma infestans*. **Fitoterapia** v.77, p.381-383, 2006.

HARRISON, P. Herbal medicine takes root in Germany. **Can. Med. Assoc.**, v.158, p.637-639, 1998.

HENSLER, J.G. Differential regulation of 5-HT_{1A} receptors-G protein interactions in brain following chronic antidepressant administration. **Neuropsychopharmacology**, v.26, p.565-573, 2002.

HERRERA-RUIZ, M.; GARCÍA-BELTRAN, Y.; MORA, S.; DÍAZ-VELIZ, G.; VIANA, G.S.B.; TORTORIELLO, J.; RAMÍREZ, G. Antidepressant and anxiolytic effects of hydroalcoholic extract from *Salvia elegans*. **J. Ethnopharmacol.**, v.107, p.53-58, 2006.

HOUGHTON, P.J.; SETH, P. Plants and the central nervous system. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v.75, p.497-499, 2003.

HUANG, S.Y.; YANG, H.T.; CHIU, C.C.; PARIANTE, C.M.; SU, K.P. Omega-3 fatty acids on the forced-swimming test. **J. Psychiatric Res.**, 2006. *In press*.

ISHIHARA, K.; SASA, M. Potentiation of 5-HT₃ receptor functions in the hippocampal CA1 region of rats following repeated electroconvulsive shock treatments. **Neurosci. Lett.**, v.307, p.37-40, 2001.

KASTER, M.P.; SANTOS, A.R.S.; RODRIGUES, A.L.S. Involvement of 5-HT_{1A} receptors in the antidepressant-like effect of adenosine in the mouse forced swimming test. **Brain Res. Bull.**, v.67, p.53-61, 2005.

KHISTI, R.T.; CHOPDE, C.T. Serotonergic agents modulate antidepressant-like effect of the neurosteroid 3alpha-hydroxy-5alpha-pregnan-20-one in mice. **Brain Res.**, v.865, p.291-300, 2000.

KOS, T.; POPIK, P.; PIETRASZEK, M.; SCHÄFER, D.; DANYSZ, W.; DRAVOLINA, O.; BLOKHINA, E.; GALANKIN, T.; BESPALOV, A.Y. Effect of 5-HT₃ receptor antagonist MDL 72222 on behaviors induced by ketamine in rats and mice. **Eur. Neuropsychopharmacol.**, v.16, p.297-310, 2006.

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

LI, Y.F., YUAN, L., XU, Y.K., YANG, M., ZHAO, Y.M., LUO, Z.P. Anti stress effect of oligosaccharides extracted from *Morinda officinalis* in mice and rats. **Acta Pharmacol. Sinica** v.22, p.1084-1088, 2001.

LINDE, K., RAMIREZ, G., MULROW, C.D., PAULS, A., WEIDENHAMMER, W., MELCHART, D. St John's Wort for depression-an overview and meta-analysis of randomized clinical trials. **Brit. Med. J.** v. 313, p.253-258, 1996.

LINDE, K.; KNÜPPEL, L. Large-scale observational studies of Hypericum extracts in patients with depressive disorders: a systematic review. **Phytomedicine**, v.12, p.148-157, 2005.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais no Brasil-nativas e exóticas**. Instituto Plantarum, 2002.

MANN, J.J.; MALON, E.K.M.; DIEHL, D.J.; PEREL, J.; COOPRE, T.B.; MINTUN, M.A. Demonstration in vivo of reduced serotonin responsivity in the brain of untreated depressed patients. **Am. J. Psych.**, v.153, p.174-181, 1996.

MANJI, H.K.; MOORE G.J.; RAJKOWSKA, G.; CHEN G. Neuroplasticity and cellular resilience in mood disorders. **Mol. Psychiatry**, v.5, p.578-593, 2000.

MANTOVANI, M.; PÉRTILE, R.; CALIXTO, J.B.; SANTOS, A.R.S.; RODRIGUES, A.L.S. Melatonin exerts an antidepressant-like effect in the tail suspension test in mice: evidence for involvement of N-methyl-D-aspartate receptors and the L-arginine-nitric oxide pathway. **Neurosci. Lett.**, v.343, p.1-4, 2003.

MATTSON, M.P.; MAUDSLEY, S.; MARTIN, B. BDNF and 5-HT: a dynamic duo in age-related neuronal plasticity and neurodegenerative disorders. **Trends Neurosci.**, v.27, p.589-594, 2004.

MCGARRY, H.; PIROTTA, M.; HEGARTY, K.; GUNN, J. General practitioners and St. John's Wort: A question of regulation or knowledge? **Complem. Ther. Medicine**, 2006. *In press*.

MICÓ, J.A.; ARDID, D.; BERROCOSO, E.; ESCHALIER, A. Antidepressants and pain. **Trends Pharmacol. Sci.**, v.27, p. 348-354, 2006.

MILLAN, M.J. The role of monoamines in the actions of established and "novel" antidepressant agents: a critical review. **Eur. J. Pharmacol.**, v.500, p.371-384, 2004.

MITANI, H.; SHIRAYAMA, Y.; YAMADA, T.; KAWAHARA, R. Plasma levels of homovanillic acid, 5- hydroxyindoleacetic acid and cortisol, and serotonin turnover in depressed patients. **Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry**, v.30, p.531-534, 2006.

MOLINA-SALINAS, G.M.; PEREZ-LOPEZ, A.; BECERRIL-MONTES, P.; SALAZAR-ARANDA, R.; SAID-FERNANDEZ, S.; TORRES, N.W. Evaluation of the flora of Northern Mexico for in vitro antimicrobial and antituberculosis activity. **J. Ethnopharmacol.**, v.109, p.435-441, 2007.

NEMEROFF, C.B.; OWENS, M.J. Treatment of mood disorders. **Nature Neurosci.**, v.5, p.1068-1070, 2002.

NEMEROFF, C.B.; VALE, W.W. The neurobiology of depression: inroads to treatment and new drug discovery. **J. Clin. Psychiatry**, v.7, p.5-13, 2005.

NESTLER, E.J.; BARROT, M.; DILEONEM, R.J.; EISCH, A.J.; GOLD, S.J.; MONTEGGIA, L.M. Neurobiology of depression. **Neuron**, v.34, p.13-25, 2002.

NOLDNER, M., SCHOTZ, K. Rutin is essential for the antidepressant activity of *Hypericum perforatum* extracts in the forced swimming test. **Planta Med.** v.68, p.577-580, 2002.

NOWAK, G.; PARTYKA, A.; PATUCHA, A.; SZEWCZYK, B.; WIERONSKA, J.M.; DYBATA, M.; METZ, M.; LIBROWSKI, T.; FROESTL, W.; PAPP, M.; PILC, A. Antidepressant-like activity of CGP 36742 and CGP51176, selective GABAB receptor antagonists, in rodents. **J. Pharmacol.**, p.1-10, 2006.

O'NEILL, M.F.; CONWAY, M.W. Role of 5-HT1A and 5-HT1B receptors in the mediation of behavior in the forced swim test in mice. **Neuropsychopharmacology**, v.24, p.391-398, 2001.

OLAFSSON, K.; JAROSZEWSKI, J.W.; SMITT, U.W.; NYMAN, U. Isolation of angiotensin converting enzyme (ACE) inhibiting triterpenes from *Schinus molle*. **Planta Med.**, v.63, p.352-355, 1996.

PAPAKOSTAS, G.I. Dopaminergic-based pharmacotherapies for depression. **Eur. Neuropsychopharmacol.**, v.16, p.391-402, 2006.

PETIT-DEMOULIERE, B.; CHENU, F.; BOURIN, M. Forced swimming test in mice : a review of antidepressant activity. **Psychopharmacology**, v.177, p.245-255, 2005.

PHILLIPS, M.L.; DREVETS, W.C.; RAUCH, S.L.; LANE, R. Neurobiology of Emotion Perception II: Implications for Major Psychiatric Disorders. **Biol. Psychiatry** v.54, p.515-528, 2003.

PORSOLT, R.D.; BERTIN, A.; JALFRE, M. Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. **Arch. Int. Pharmac. Ther.**, v. 229, p. 327-336, 1977.

POZZO-BALBI, T.; NOBILE, L.; SCAPINI, G.; CINI, M. The triterpenoid acids of *Schinus molle*. **Phytochemistry.**, v.17, p.2107-2110, 1978.

PRYCE, C.R.; BETTSCHEN, D.R.; DETTLING, A.C.; WESTON, A.; RUSSIG, H.; FERGER, B.; FELDON, J. Long-term effects of early-life environmental manipulations in rodents and primates: Potential animal models in depression research. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, v.29, p.649-674, 2005.

QUIROGA, E.N.; SAMPIETRO, A.R.; VATTUONE, M.A. Screening antifungal activities of selected medicinal plants. **J. Ethnopharmacol.**, v.74, p.89-96, 2001.

REDROBE, J.P.; BOURIN, M. Partial role of 5-HT2 and 5-HT3 receptors in the activity of antidepressants in the mouse forced swimming test. **Eur. J. Pharmacol.**, v.325, p.129-135, 1997.

REDROBE, J.P.; BOURIN, M.; COLOMBEL, M.C.; BAKER, G.B. Dose-dependent noradrenergic and serotonergic properties of venlafaxine in animal models indicative of antidepressant activity. **Psychopharmacology**, v.138, p.1-8, 1998a.

REDROBE, J.P.; BOURIN, M.; COLOMBEL, M.C.; BAKER, G.B. Psychopharmacological profile of the selective serotonin reuptake inhibitor, paroxetine: implication of noradrenergic and serotonergic mechanisms. **J. Psychopharmacol.**, v.12, p.348–355, 1998b.

RENARD, C.E.; FIOCCO, A.J.; CLENET, F.; HASCOËT, M.; BOURIN, M.S. Is dopamine implicated in the antidepressant-like effects of selective serotonin reuptake inhibitors in the mouse forced swimming test? **Eur. Neuropsychopharmacol.**, v.11, p.208-209, 2001.

RISCH, S.C., NEMEROFF, C.B. Neurochemical alterations of serotonergic neuronal systems in depression. **J. Clin. Psychiatry**, v.53, p.3-7, 1992.

RODRIGUES, A.L.S.; SILVA, G.L.; MATTEUSSI, A.S.; FERNANDES, E.; MIGUEL, O.; YUNES, R.A.; et al. Involvement of monoaminergic system in the antidepressant-like effect of the hydroalcoholic extract of *Siphocampylus verticillatus*. **Life Sci.**, v.70, p.1347-1358, 2002.

ROJAS-CORRALES, M.O.; CASAS, J.; MORENO-BREA, M.R.; GIBERT-RAHOLA, J.; MICO, J.A. Antinociceptive effects of tricyclic antidepressants and their noradrenergic metabolites. **Eur. Neuropsychopharmacol.** v.13, p.355-363, 2003.

RUFFA, M.J.; FERRARO, G.; WAGNER, M.L.; CALCAGNO, M.L.; CAMPOS, R.H.; CAVALLARO, L. Cytotoxic effect of Argentine medicinal plant extracts on human hepatocellular carcinoma cell line. **J. Ethnopharmacol.**, v.79, p.335-339, 2002.

SALEM, A.Z.M.; SALEM, M.Z.M.; EL-ADAWYA, M.M.; ROBINSON, P.H. Nutritive evaluations of some browse tree foliage during the dry season: Secondary compounds, feed intake and *in vivo* digestibility in sheep and goats. **Animal Feed Sci. Techn.**, v. 127, p.251-267, 2006.

SCHLOSS, P.; HENN, F.A.; New insights into the mechanisms of antidepressant therapy. **Pharmacol. Ther.**, v.102, p.47-60, 2004.

SCHMOURLO, G.; MENDONÇA-FILHO, R.R.; ALVIANO, C.S.; COSTA, S.S. Screening of antifungal agents using ethanol precipitation and bioautography of medicinal and food plants. **J. Ethnopharmacol.**, v.96, p.563-568, 2005.

SHER, L.; MANN, J.J.; TRASKMAN-BENDZ, L.; WINCHEL, R.; HUANG, Y.Y.; FERTUCK, E.; STANLEY, B.H. Lower cerebrospinal fluid homovanillic acid levels in depressed suicide attempters. **J. Affect. Disord.**, v.90, p.83-89, 2006.

SHIRAYAMA, Y.; ISHIDA, H.; IWATA, M.; HAZAMA, G.; KAWAHARA, R.; DUMAN, R.S. Stress increases dynorphin immunoreactivity in limbic brain regions and dynorphin antagonism produces antidepressant-like effects. **J. Neurochem.**, v.90, p.1258-1268, 2004.

SKOLNICK, P. Antidepressants for the new millennium. **Eur. J. Pharmacol.**, v.375, p.31-40, 1999.

SKOLNICK, P.; LEGUTKO, B.; LI, X.; BYMASTER, F.P. Current perspectives on the development of non-biogenic amine-based antidepressants. **Pharmacol. Res.**, v.43, p.411-422, 2001.

SOON, Y.Y.; TAN, B.K. Evaluation of the hypoglycemic and anti-oxidant activities of *Morinda officinalis* in streptozotocin-induced diabetic rats. **Sing. Med. J.**, v.43, p.77-85, 2002.

STAHL, S.M. **Essencial Psychopharmacology de Depression and Bipolar disorder.**, 2000.

STERU, L.; CHERMAT, R.; THIERRY, B.; SIMON, P. The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. **Psychopharmacology**, v.85, p.367-370, 1985.

TAYLOR, C.; FRICKER, A.D.; DEVI, L.A.; GOMES, I. Mechanisms of action of antidepressants: from neurotransmitter systems to signaling pathways. **Cel. Signal.**, v.17, p. 549-557, 2005a.

TAYLOR, L. The Healing Power of Rainforest Herbs. **A Guide to Understanding and Using Herbal Medicinals.**, Square One Publishers, 2005b.

TORRES, G.E.; GAINETDINOV, R. R.; CARON, M.G. Plasma membrane monoamine transporters: structure, regulation and function. **Nat. Rev. Neurosci.**, v.4, p. 13-25, 2003.

VIANA, A.; REGO, J.; POSER, G.; FERRAZ, A.; HECKLER, A.P.; COSTENTIN, J.; RATES, S.M.K. The antidepressant-like effect of *Hypericum caprifoliatum* Cham & Schlecht (Guttiferae) on forced swimming test results from an inhibition of neuronal monoamine uptake. **Neuropharmacology**, v.49, p.1042-1052, 2005.

ZARATE, C.A.; J.R.; SINGH, J.; MANJI, H.K. Cellular Plasticity Cascades: Targets for the Development of Novel Therapeutics for Bipolar Disorder. **Biol. Psychiatry**, v.59, p.1006-1020, 2006.

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

ZOMKOWSKI, A.D.E.; ROSA, A.O.; LIN, J.; SANTOS, A.R.S.; CALIXTO, J.B.; RODRIGUES, A.L.S. Evidence for serotonin receptor subtypes involvement in agmatine antidepressant like-effect in the mouse forced swimming test. **Brain Res.**, v.1023, p.253-263, 2004.

WAEHRENS, J.; GERLACH, J. Bromocriptine and imipramine in endogenous depression. A double-blind controlled trial in out-patients. **J. Affect. Disord.**, v.3, p.193-202, 1981.

WONG, M.; LICINIO, J. Research and treatment approaches to depression. **Nat. Rev. Neurosci.**, v.2, p.343-351, 2001.

WONG, D.T.; PERRY, K.W.; BYMASTER, F.P. The discovery of fluoxetine hydrochloride (Prozac). **Nat. Rev. Drug Discov.**, v.4, p.764-774, 2005.

WHISKEY, E.; WERNEKE, U.; TAYLOR, D. A systematic review and meta-analysis of *Hypericum perforatum* in depression: a comprehensive clinical. **Int. Clin. Psychopharmacol.**, v.16, p.239-52, 2001.

YAMADA, J.; SUGIMOTO, Y.; YAMADA, S. Involvement of dopamine receptors in the anti-immobility effects of dopamine re-uptake inhibitors in the forced swimming test. **Eur J Pharmacol.**, v.504, p.207-211, 2004.

YU, Z.F.; KONG, L.D.; CHEN, Y. Antidepressant activity of aqueous extracts of *Curcuma longa* in mice. **J. Ethnopharmacol.**, v.83, p.161-165, 2002.

YUEQIN, Z.; RECIO, M.C.; MANEZ, S.; GINER, R.M.; CERDA-NICOLAS, M.; RIOS, J.L. Isolation of two triterpenoids and a biflavanone with anti-inflammatory activity from *Schinus molle* fruits. **Planta Med.**, v.69, p.893-898, 2003.

9. Anexos

Antidepressant-like effect of the extract from leaves of *Schinus molle* L. in mice: Evidence for the involvement of the monoaminergic system

Daniele G. Machado^a, Manuella P. Kaster^a, Ricardo W. Binfaré^a, Munique Dias^c,
Adair R.S. Santos^b, Moacir G. Pizzolatti^c, Inês M.C. Brighente^c, Ana Lúcia S. Rodrigues^{a,*}

^a Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Brazil

^b Departamento de Ciências Fisiológicas, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Brazil

^c Departamento de Química, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Universitário — Trindade-88040-900, Florianópolis-SC, Brazil

Received 8 July 2006; received in revised form 1 November 2006; accepted 2 November 2006

Available online 19 December 2006

Abstract

Schinus molle L. (Anacardiaceae), among other uses, is popularly employed for the treatment of depression. In this study, the antidepressant-like effect of the hexanic extract from leaves of *S. molle* was investigated in the mouse tail suspension test (TST), a predictive model of depression. The immobility time in the TST was significantly reduced by the extract (dose range 30–600 mg/kg, p.o.), without accompanying changes in ambulation when assessed in an open-field test. The efficacy of extract was found to be comparable to that of fluoxetine (10 mg/kg, p.o.). The anti-immobility effect of the extract (100 mg/kg, p.o.) was prevented by pretreatment of mice with *p*-chlorophenylalanine methyl ester (PCPA, 100 mg/kg, i.p., an inhibitor of serotonin synthesis, for four consecutive days), NAN-190 (0.5 mg/kg, i.p., a 5-HT_{1A} receptor antagonist), WAY100635 (0.1 mg/kg, s.c., a selective 5-HT_{1A} receptor antagonist), ketanserin (5 mg/kg, i.p., a 5-HT_{2A/2C} receptor antagonist), MDL72222 (0.1 mg/kg, i.p., a 5-HT₃ receptor antagonist), prazosin (1 mg/kg, i.p., an α_1 -adrenoceptor antagonist), yohimbine (1 mg/kg, i.p., an α_2 -adrenoceptor antagonist), SCH23390 (0.05 mg/kg, s.c., a D₁ receptor antagonist) or sulpiride (50 mg/kg, i.p., a D₂ receptor antagonist). It may be concluded that the hexanic extract of *S. molle* produces an antidepressant-like effect that seems to be dependent on its interaction with the serotonergic, noradrenergic and dopaminergic systems. These results provide evidence that the extract from *S. molle* shares with established antidepressants some pharmacological effects, at least at a preclinical level.

© 2006 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Depression; Dopamine; Noradrenaline; *Schinus molle*; Serotonin; Tail suspension test

1. Introduction

Schinus molle L. is a pepper tree belonging to the family Anacardiaceae. It originates from South America, but has been introduced to most of the tropical and subtropical areas of the world (Taylor, 2005).

Pharmacological studies carried out with extracts from *S. molle* show that this plant exerts several biological effects, such as: hypotensive (Bello et al., 1996), antitumoral (Ruffa et al., 2002), antifungal (Quiroga et al., 2001; Schmourlo et al., 2005), antispasmodic (Bello et al., 1998), anti-inflammatory (Yueqin et al., 2003), and analgesic (Barrachina et al., 1997). Other properties/actions of *S. molle* suggested by traditional use are: antihemorrhagic, antiseptic, aperient (mild laxative), astringent,

Abbreviations: ANOVA, analysis of variance; DMSO, dimethylsulfoxide; 5-HT, serotonin; MAOI, monoamine oxidase inhibitor; MDL72222, tropanyl 3, 5-dichlorobenzoate; NAN-190, 1-(2-methoxyphenyl)-4-(2-phthalimido)butyl piperazine; PCPA, *p*-chlorophenylalanine methyl ester; SCH23390, (R)-(+)-7-chloro-8-hydroxy-3-methyl-1-phenyl-2,3,4,5-tetrahydro-1H-3-benzazepine hydrochloride; SKF 38393, (1-phenyl-7,8-dihydroxy-2,3,4,5-tetrahydro-1H-3-benzazepine) hydrochloride; *S. molle*, *Schinus molle*; SSRI, selective serotonin reuptake inhibitor; TST, tail suspension test; WAY100635, N-[2-[4-(2-methoxyphenyl)-1-piperazinyl]ethyl]-N-(2-pyridinyl) cyclohexanecarboxamide.

* Corresponding author. Tel.: +55 48 3331 5043; fax: +55 48 3331 9672.

E-mail addresses: analucia@mbx1.ufsc.br, alsrodri@terra.com.br (A.L.S. Rodrigues).

cardiotonic, digestive stimulant, diuretic, menstrual stimulant, stimulant, tonic, and antidepressant (Taylor, 2005).

Depression is a common disorder associated with high rates of chronicity, relapse, and recurrence; psychosocial and physical impairment; and a high suicide rate. Currently available therapy for depression treatment is often associated with several undesirable side effects, and it is effective only in a certain portion of the population (Wong and Licinio, 2001; Nestler et al., 2002). Therefore, the identification of alternative therapeutic tools for the treatment of depression is still needed. Herbal therapies may be effective alternatives in the treatment of depression, as in the case of St John's wort (Whiskey et al., 2001; Bilia et al., 2002; Linde and Knüppel, 2005), and the search for novel pharmacotherapy from medicinal plants for psychiatric illnesses, including depression, has progressed significantly in the past decade (Zhang, 2004). It is interesting to note that most of the novel treatments for depression (including St. John's wort) seem to act through a mechanism which does not differ significantly with respect to that of "classical" antidepressants.

In spite of the popular use of *S. molle* to treat depression (Taylor, 2005) there is no scientific evidence about potential effects of this plant in animal models of depression. Thus, this study aims, firstly, to examine the antidepressant-like action of the hexanic extract from leaves of *S. molle* in the mouse tail suspension test (TST), a model predictive of antidepressant activity (Steru et al., 1985; Cryan et al., 2005) and, secondly, to investigate by the use of pharmacological procedures the possible participation of the monoaminergic system in its antidepressant-like action.

2. Methods

2.1. Plant material and preparation of the hexanic extract

Stems and leaves of *Schinus molle* L. (Anacardiaceae) were collected in Florianópolis, Santa Catarina, and identified by Dr. Daniel Falkenberg, Department of Botany, Federal University of Santa Catarina. A voucher specimen (FLOR 34411) was deposited in the Herbarium of the Department of Botany, Federal University of Santa Catarina, Santa Catarina, Brazil. Botanical material (390 g) were dried under air circulation and minced. Dried sample was extracted with hexane at room temperature (25 ± 2 °C) for 15 days. Thereafter, the extract was filtered and then concentrated under reduced pressure (at approximately 60°). The maceration was repeated three times. The evaporation of solvent yielded a residue of 17.8 g of dried extract (4.6% w/w yield). The remaining residue was kept in a refrigerator and dissolved in saline with 10% Tween 80 before the behavioral tests. The preliminary chemical composition of the hexanic extract from *S. molle* was demonstrated by thin layer chromatography (TLC) and gas chromatography (GC) analysis that revealed the presence of a high content of triterpenes, but not of flavonoids or tannins. Thus, further investigations are needed to determine the structure of the triterpenes and also to identify the active principles present in hexanic extract of *S. molle*.

2.2. Animals

Male Swiss mice (35–45 g) were maintained at constant room temperature (22–25 °C) with free access to water and food, under a 12:12 h light:dark cycle (lights on at 07:00 h). All experiments were carried out between 11:00 and 16:00 h, with each animal used only once ($N=5-12$ animals per group). The procedures in this study were performed in accordance with the National Institute of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals and approved by the Ethics Committee of the Institution. All efforts were made to minimize animals suffering and to reduce the number of animals used in the experiments.

2.3. Drugs and treatment

The following drugs were used: ketanserin tartarate, 1-(2-methoxyphenyl)-4[-(2-phthalimido)butyl]piperazine (NAN-190), *p*-chlorophenylalanine methyl ester (PCPA), *N*-{2-[4-(2-methoxyphenyl)-1-piperazinyl]ethyl}-*N*-(2-pyridinyl) cyclohexanecarboxamide (WAY100635), tropanyl 3, 5-dichlorobenzoate (MDL72222), sulpiride, prazosin, yohimbine, (*R*)-(+)-7-chloro-8-hydroxy-3-methyl-1-phenyl-2,3,4,5-tetrahydro-1H-3-benzazepine hydrochloride (SCH23390), fluoxetine (all from Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, U.S.A.). All drugs were administered by intraperitoneal (i.p.) route in a constant volume of 10 ml/kg body weight except SCH 23390 and WAY100635 that were administered by subcutaneous (s.c.) route (10 ml/kg body weight). Drugs were dissolved in saline except NAN-190 and MDL72222, that were diluted in saline with 1% Tween 80 and sulpiride that was diluted in saline with 5% dimethylsulfoxide (DMSO). Control animals received appropriate vehicle.

The extract of *S. molle* or vehicle was administered by oral route (p.o.) 60 min before the TST or open-field test. Fluoxetine (10 mg/kg, p.o., a classical antidepressant) was used as a positive control. To address some of the mechanisms by which the extract of *S. molle* causes antidepressant-like action in the TST, animals were treated with different drugs. The doses of the drugs used were selected on the basis of literature data and on previous results from our laboratory (O'Neill and Conway, 2001; Redrobe and Bourin, 1997; Rodrigues et al., 2002; Yamada et al., 2004; Kaster et al., 2005).

In order to investigate a possible contribution of the serotonergic system to the effect of the extract of *S. molle* in reducing the immobility time in the TST, animals were pretreated with PCPA (100 mg/kg, an inhibitor of serotonin synthesis) or vehicle, once a day, for 4 consecutive days (Rodrigues et al., 2002; Gavioli et al., 2004; Kaster et al., 2005). Then, 24 h after the last PCPA or saline injection, animals were treated with the extract of *S. molle* (100 mg/kg, p.o.), or vehicle and were tested in the TST 60 min later.

In a separate series of experiments, the involvement of the serotonin (5-HT) receptor subtypes in the effect of the extract of *S. molle* in the TST was studied. In order to investigate the possible involvement of the serotonergic system in the antidepressant-like effect of the extract, mice were pretreated with NAN-190 (0.5 mg/kg, i.p. a 5-HT_{1A} receptor antagonist),

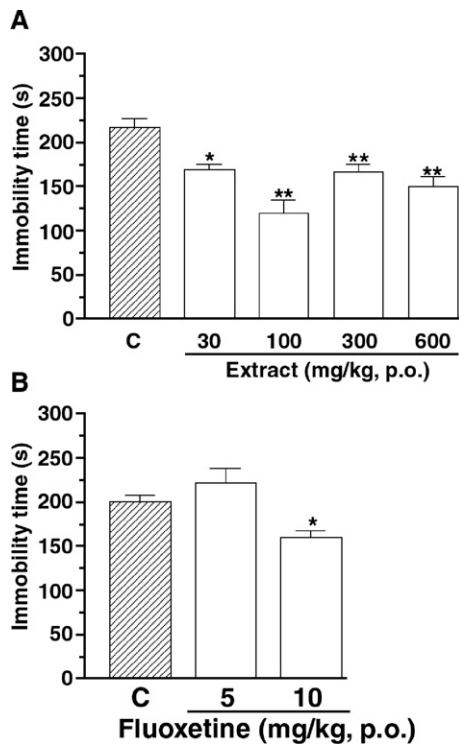


Fig. 1. Effect of treatment of mice with the hexanic extract of *S. molle* or fluoxetine given orally on the immobility time in the TST. Each column represents the mean+S.E. of 6–7 animals. * $P<0.05$; ** $P<0.01$ compared with the vehicle-treated control (C).

WAY100635 (0.1 mg/kg, s.c., a selective 5-HT_{1A} receptor antagonist), ketanserin (5 mg/kg, a preferential 5-HT_{2A} receptor antagonist), MDL72222 (0.1 mg/kg, i.p., a selective 5-HT₃ receptor antagonist) or vehicle and after 30 min they received the extract of *S. molle* (100 mg/kg, p.o.) or vehicle injection before being tested in the TST 60 min later.

To assess the possible involvement of the noradrenergic and the dopaminergic systems on the antidepressant-like effect of the extract in the TST, animals were pretreated with prazosin (1 mg, i.p., an α_1 -adrenoceptor antagonist), yohimbine (1 mg/kg, i.p., an α_2 -adrenoceptor antagonist), SCH23390 (0.05 mg/kg, s.c., a D₁ receptor antagonist) or sulpiride (50 mg/kg, i.p., a D₂ receptor antagonist), and after 30 min they received the extract of *S. molle* (100 mg/kg, p.o.) or vehicle and were tested in the TST 60 min later.

The administration schedule was chosen on the basis of experiments previously performed in our laboratory and literature data confirm the efficacy of the above-mentioned protocol (Viana et al., 2005).

2.4. Tail suspension test (TST)

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; Mantovani et al., 2003).

2.5. Open-field behavior

To assess the possible effects of the extract of *S. molle* on locomotor activity, mice were evaluated in the open-field paradigm as previously described (Rodrigues et al., 2002). Mice were individually placed in a wooden box (40×60×50 cm) with the floor divided into 12 squares. The number of squares crossed with the four paws was registered during a period of 6 min. Animals were treated with the extract of *S. molle* (100, 300 and 600 mg/kg) or with vehicle given by the oral route 1 h before the experiments.

2.6. Statistical analysis

Comparisons between experimental and control groups were performed by one or two-way ANOVA followed by Tukey's HSD test when appropriate. A value of $P<0.05$ was considered to be significant.

3. Results

3.1. Effect of the extract of *S. molle* on the immobility time in the TST

The effects of oral administration of the extract of *S. molle* and fluoxetine on the immobility time in the TST were shown in Fig. 1A and B, respectively. As depicted in Fig. 1A, the extract given by oral route at doses of 30, 100, 300 and 600 mg/kg significantly decreased the immobility time as compared to the control group. The one-way ANOVA revealed a significant effect of treatment [$F(4,25)=11.14$, $P<0.01$]. As a positive control, we show that the antidepressant fluoxetine (10 mg/kg, p.o.) also produced a significant reduction in the immobility time in the TST (Fig. 1B). The one-way ANOVA revealed a main effect of treatment [$F(2,18)=8.15$, $P<0.01$].

3.2. Effect of the extract of *S. molle* on the open-field test

As shown in Fig. 2 the extract of *S. molle* (dose range 100–600 mg/kg, p.o.) did not significantly alter the locomotor activity of mice in the open-field test as compared to control

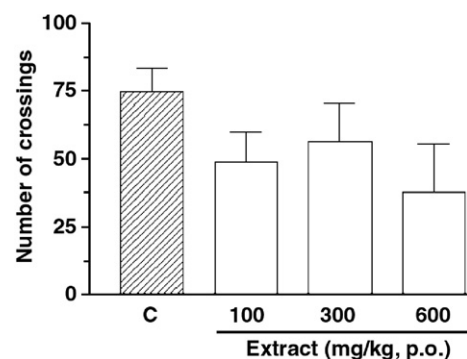


Fig. 2. Effect of treatment of mice with the hexanic extract of *S. molle* given orally on the number of crossings in the open-field test. Each column represents the mean+S.E. of 5–6 animals.

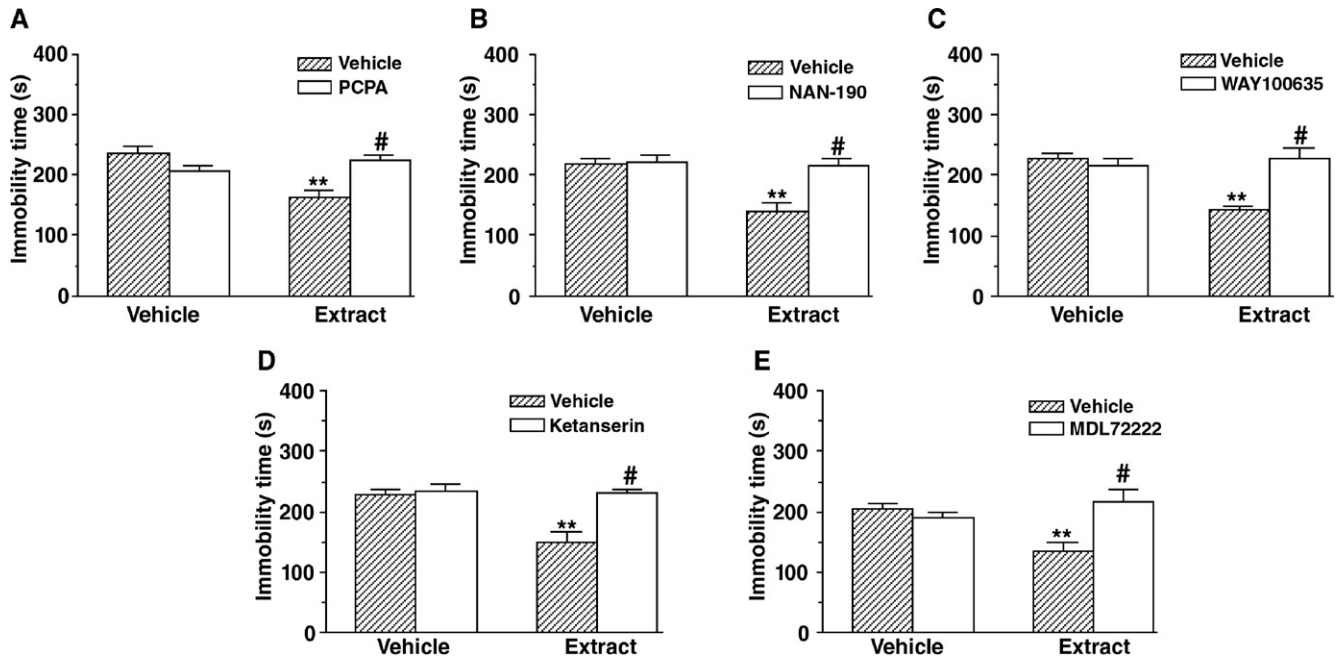


Fig. 3. Effect of pretreatment of mice with PCPA (100 mg/kg, i.p. once a day for 4 consecutive days, panel A), NAN-190 (0.5 mg/kg, i.p., panel B), WAY100635 (0.1 mg/kg, s.c., panel C), ketanserin (5 mg/kg, i.p., panel D), or with MDL72222 (0.1 mg/kg, i.p., panel E) on the hexanic extract of *S. molle* (100 mg/kg, p.o.)-induced reduction in immobility time in the TST. Each column represents the mean + S.E. of 6–9 animals. ** $P < 0.01$ compared with the vehicle-treated control. # $P < 0.01$ as compared with the same group pretreated with vehicle.

group, as revealed by one-way ANOVA [$F(3,18) = 1.38$, $P = 0.27$].

3.3. Investigation of some possible mechanisms underlying the antidepressant-like effect of the extract of *S. molle* in the TST

3.3.1. Involvement of the serotonergic system

Fig. 3A shows that the pretreatment of mice with the inhibitor of serotonin synthesis PCPA (100 mg/kg, i.p., once a day for 4 consecutive days) significantly prevented the decrease in the immobility time elicited by the extract (100 mg/kg, p.o.). The results obtained in this experiment were analyzed by a two-way ANOVA. There was a significant effect of treatment [$F(1,26) = 7.47$, $P < 0.01$], treatment X pretreatment interaction [$F(1,26) = 19.55$, $P < 0.01$], but not of pretreatment [$F(1,26) = 2.39$, $P = 0.13$]. Moreover, the pretreatment of mice with NAN-190 (0.5 mg/kg, i.p.) also prevented the antidepressant-like effect elicited by the extract. A two-way ANOVA showed significant differences for treatment [$F(1,20) = 14.56$, $P < 0.01$], pretreatment [$F(1,20) = 11.67$, $P < 0.01$] and treatment X pretreatment interaction [$F(1,20) = 10.57$, $P < 0.01$], Fig. 3B. In addition, the results depicted in Fig. 3C show that the pretreatment of animals with WAY100635 (0.1 mg/kg, s.c.) prevented the effect of the extract of *S. molle* in the TST. A two-way ANOVA showed significant differences for treatment [$F(1,23) = 9.49$, $P < 0.01$], pretreatment [$F(1,23) = 10.24$, $P < 0.01$] and treatment X pretreatment interaction [$F(1,23) = 16.20$, $P < 0.01$]. Fig. 3D shows that the pretreatment of mice with ketanserin (5 mg/kg, i.p.) also prevented the action of the extract in the TST. The two-way ANOVA revealed a main effect of the treatment [$F(1,19) = 10.65$, $P < 0.01$], pretreatment [$F(1,19) =$

12.58, $P < 0.01$] and treatment X pretreatment interaction [$F(1,19) = 9.35$, $P < 0.01$]. Fig. 3E shows that MDL72222 (0.1 mg/kg, i.p.) completely blocked the anti-immobility effect

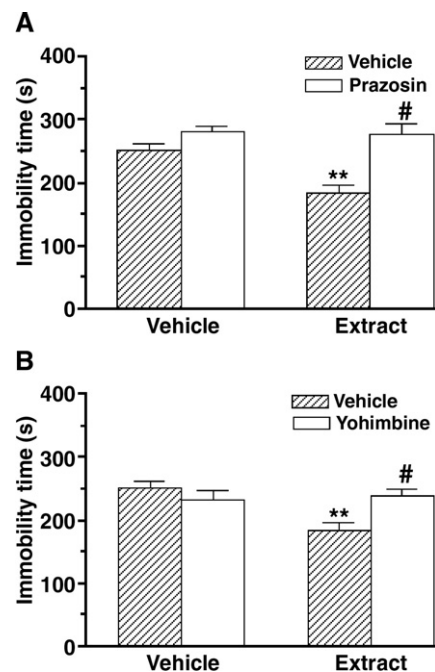


Fig. 4. Effect of pretreatment of mice with prazosin (1 mg/kg, i.p., panel A) or with yohimbine (1 mg/kg, i.p., panel B) on the hexanic extract of *S. molle* (100 mg/kg, p.o.)-induced reduction in immobility time in the TST. Each column represents the mean + S.E. of 6–8 animals. ** $P < 0.01$ compared with the vehicle-treated control. # $P < 0.01$ as compared with the same group pretreated with vehicle.

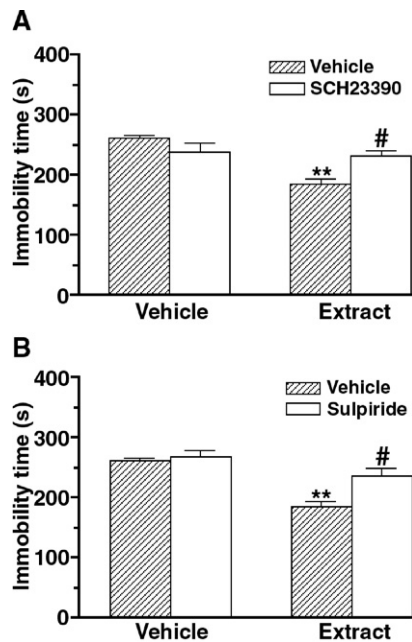


Fig. 5. Effect of pretreatment of mice with SCH23390 (0.05 mg/kg, s.c., panel A) or with sulpiride (50 mg/kg, i.p., panel B) on the hexanic extract of *S. molle* (100 mg/kg, p.o.)-induced reduction in immobility time in the TST. Each column represents the mean + S.E. of 9–12 animals. ** $P < 0.01$ compared with the vehicle-treated control. # $P < 0.01$ as compared with the same group pretreated with vehicle.

of the extract of *S. molle* in the TST. The results were analyzed by a two-way ANOVA that showed a significant effect of pretreatment [$F(1,30) = 6.09$, $P < 0.01$], treatment X pretreatment interaction [$F(1,30) = 12.02$, $P < 0.01$], but not of treatment ($F(1,30) = 2.52$, $P = 0.12$).

3.3.2. Involvement of the noradrenergic system

The results depicted in Fig. 4A show that pretreatment of mice with prazosin (1 mg/kg, i.p.) was able to reverse the antidepressant-like effect the extract of *S. molle* (100 mg/kg, p.o.) in the TST. The two-way ANOVA revealed a main effect of the treatment [$F(1,22) = 7.09$, $P < 0.05$], pretreatment [$F(1,22) = 20.94$, $P < 0.01$] and treatment X pretreatment interaction [$F(1,22) = 5.75$, $P < 0.05$]. Fig 4B shows that the pretreatment of mice with yohimbine (1 mg/kg, i.p.) was also able to prevent the anti-immobility effect the extract of *S. molle* (100 mg/kg, p.o.) in the TST. The two-way ANOVA revealed a main effect of the treatment [$F(1,23) = 5.85$, $P < 0.05$], treatment X pretreatment interaction [$F(1,23) = 8.87$, $P < 0.01$], but not of the pretreatment [$F(1,23) = 1.97$, $P = 0.17$].

3.3.3. Involvement of the dopaminergic system

The anti-immobility effect of the extract of *S. molle* (100 mg/kg, p.o.) was significantly prevented by pretreatment of mice with SCH23390 (0.05 mg/kg, s.c., Fig 5A). The two-way ANOVA revealed a main effect of the treatment [$F(1,36) = 22.36$, $P < 0.01$], treatment X pretreatment interaction [$F(1,36) = 15.32$, $P < 0.01$], but not of pretreatment [$F(1,36) = 1.88$, $P = 0.17$]. Fig 5B shows that sulpiride (50 mg/kg, i.p., 5B) was also able to prevent the anti-immobility effect of the extract of *S. molle* in the

TST. The two-way ANOVA revealed a main effect of the treatment [$F(1,37) = 32.59$, $P < 0.01$], pretreatment [$F(1,37) = 8.75$, $P < 0.01$] and of treatment X pretreatment interaction [$F(1,37) = 5.01$, $P < 0.05$].

4. Discussion

The TST is a well characterized behavioral model predictive of antidepressant activity that is sensitive to antidepressants from different pharmacological classes (Steru et al., 1985; Cryan et al., 2005). In this study we provide convincing evidence that the extract of *S. molle* administered by oral route produces a specific antidepressant-like effect in this test, since the reduction of immobility time elicited by its administration cannot be attributable to any psychostimulant effect. Furthermore, the effect of the extract of *S. molle* in the TST was similar to the effect produced by the oral administration of fluoxetine, used as a positive control.

This study also analyzes some of the possible mechanisms related to the antidepressant-like effects observed for the extract of *S. molle*. As monoaminergic system is one of the most important targets in the pathophysiology and treatment of depression (Elhwuegi, 2004; Millan, 2004), we investigated the involvement of the serotonergic, noradrenergic and dopaminergic systems in its anti-immobility effect in the TST. Thus, we have assessed herein the effects of several pharmacological antagonists on the anti-immobility action of the extract of *S. molle* (100 mg/kg, p.o., 1 h before) in mice.

Depressive disorder has long been associated with disturbances of brain 5-HT activity and data concerning 5-HT variations in depression have probably been the most widely studied. Moreover, the serotonergic system plays a major role in the action of antidepressants (Millan, 2004). The involvement of the serotonergic system in the antidepressant-like effect of the extract of *S. molle* is indicated by the results showing that its effect in the TST was completely prevented by pretreatment of mice with the neuronal serotonin store depletor, PCPA as well as with the 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A} and 5-HT₃ antagonists WAY100635, ketanserin and MDL72222, respectively.

PCPA is an inhibitor of tryptophan hydroxylase and its administration, for four consecutive days, depletes the endogenous stores of 5-HT by about 60% in mice (Redrobe et al., 1998b). PCPA treatment used in the present study produces partial but highly significant reductions on brain 5-HT levels while noradrenaline and dopamine levels are not affected (Redrobe et al., 1998a,b). Moreover, the same treatment with PCPA was previously shown by our group to completely prevent the antidepressant-like effect of fluoxetine, leaving the antidepressant action caused by imipramine in the TST unaffected (Rodrigues et al., 2002).

Studies have demonstrated the involvement of 5-HT_{1A} receptors in the mechanism of action of several classes of antidepressant drugs, including tricyclics, SSRIs (selective serotonin reuptake inhibitors) and MAOi (monoamine oxidase inhibitors) (Hensler, 2002). An evidence of the involvement of 5-HT_{1A} receptors in the antidepressant-like effect of the extract of *S. molle* was given by the finding that the selective 5-HT_{1A}

receptor antagonist WAY100635 was able to prevent its anti-immobility effect in the TST.

A role for 5-HT₂ receptors in the action of some antidepressants has been shown. Many established antidepressants are 5-HT₂ receptor antagonists and share the ability to decrease 5-HT₂ receptor binding after repeated administration. The down-regulation of 5-HT_{2A} receptors is proposed to mediate the long-term actions of antidepressants (Deakin, 1988). In the present work, the pretreatment of animals with ketanserin was able to reverse the anti-immobility effect of the extract of *S. molle* in the TST, providing evidence of the participation of 5-HT₂ receptors in its effect in the TST. A similar result was reported in previous studies from our group in which ketanserin was able to reverse the antidepressant-like effect of agmatine (Zomkowski et al., 2004) and of the lectin from *Canavalia brasiliensis* (Barauna et al., 2006) in the mouse forced swimming test. In addition, the preferential 5-HT_{2A} receptor agonist DOI was reported to enhance the antidepressant-like effect of some compounds (Zomkowski et al., 2004; Khisti and Chopde, 2000). Thus, the present study indicates that the antidepressant-like effect of the extract of *S. molle* appears to be mediated by stimulation of 5-HT_{2A} receptors.

We also investigate the participation of 5-HT₃ receptors in the antidepressant-like effect of the extract of *S. molle*. The pretreatment of animals with MDL72222 was able to prevent the anti-immobility effect of the extract in the TST, demonstrating that this effect is mediated, at least in part, by an interaction with this serotonergic receptor subtype. The involvement of 5-HT₃ receptors in the pathophysiology of depression is much less studied than 5-HT_{1A} and 5-HT₂. However, literature data demonstrate that different classes of antidepressants act as functional antagonists at the 5-HT₃ receptors, indicating that the suppression of 5-HT₃ receptor activity may contribute to the action of antidepressants (Eisensamer et al., 2003). Moreover, a recent study has shown that MDL72222 administered at a higher dose (3 mg/kg, i.p.) in mice produced an antidepressant-like effect in the TST (Kos et al., 2006). Although the apparent inconsistency with previous data, the reversal of the antidepressant-like effect of the extract of *S. molle* by MDL72222 suggests that its antidepressant-like effect is mediated by an activation of 5-HT₃ receptors. In fact, in line with this hypothesis is the finding that electroconvulsive therapy, which is clinically used to treat drug resistant depression, was able to potentiate the function of 5-HT₃ receptors in the hippocampus (Ishihara and Sasa, 2001).

The role of noradrenaline in the pathophysiology of depression has been also extensively studied, since some antidepressant drugs increase the synaptic concentration of NA and some of these drugs were found to act directly at noradrenergic receptor (Elhwuegi, 2004). In addition, it was recently demonstrated that NA-deficient mice lack responses to antidepressant drugs, including SSRIs (Cryan et al., 2004). In our study both prazosin (an α_1 -adrenoceptor antagonist) and yohimbine (an α_2 -adrenoceptor antagonist) were able to reverse the antidepressant-like effect of the extract of *S. molle*. This result indicates that the extract may exert its effect in the TST by interacting with both α_1 and α_2 -adrenoceptors. Accordingly,

there is compelling evidence for a role of α_1 and α_2 -adrenoceptors in the actions of antidepressant agents (Millan, 2004).

The dopaminergic system is also strongly implicated in regulation of mood (Dailly et al., 2004). Some biochemical evidence derives from clinical studies showing that the plasma levels of homovanillic acid and 3,4-dihydroxyphenylacetic acid, two dopamine metabolites, were significantly lower in the depressed patients, indicating a diminished dopamine turnover (Mitani et al., 2006; Sher et al., 2006). It has been considered that the potentiation of dopaminergic neurotransmission induced by chronic antidepressant treatments might contribute to their therapeutic effect (D'Aquila et al., 2000) and there is also a considerable amount of pharmacological evidence regarding the efficacy of antidepressants with dopaminergic effects in the treatment of depression (Papakostas, 2006). As shown in the results, the selective dopamine D₁ receptor antagonist SCH 23390 and the dopamine D₂ receptor antagonist, sulpiride significantly antagonized the anti-immobility effects of the extract of *S. molle* in the TST. Our results are in accordance with literature data indicating that both dopamine D₁ and D₂ receptors might play a role in depression. Indeed Yamada et al. (2004) suggested that dopamine D₁ and D₂ receptors play a role in the effects of dopamine reuptake inhibitors on forced swimming test, another animal model predictive of antidepressant activity. In addition, it was reported that the dopamine D₁ receptor agonist SKF 38393 enhances anti-immobility effects of SSRIs, suggesting that the dopamine D₁ receptor may participate in the antidepressant effects of SSRIs (Renard et al., 2001). It was also reported that the anti-immobility effects of the tricyclic antidepressant imipramine were reduced by antisense dopamine D₂ receptor (Dziedzicka-Wasylewska et al., 2000). Indeed, clinical studies reported that dopamine D₂ receptor agonists are effective for treating depressive patients (Wahrens and Gerlach, 1981).

In summary, our data indicate an antidepressant-like effect of the hexanic extract of *S. molle*, which is not due to any psychostimulant effect and that seems to be mediated by an interaction with the monoaminergic system. It is interesting to note that a low toxicity was reported for the extract obtained from the leaves of *S. molle* (Barrachina et al., 1997). Phytochemical studies have identified active components from *S. molle* such as tannins, triterpenoids, flavonoids and saponins (Pozzo-Balbi et al., 1978; Olafsson et al., 1997; Yueqin et al., 2003; Taylor, 2005). However, a preliminary characterization of the hexanic extract used in the present study did not show the presence of flavonoids and tannins. This extract contains triterpenoids as major compounds. Further chemical analysis of the extract will be conducted to isolate and characterize the active principles responsible for the observed effects.

5. Conclusion

In conclusion, the present study provides the first evidence indicating that the hexanic extract of *S. molle* produces a specific antidepressant-like effect in an animal model predictive of antidepressant properties, the TST, similar to the result

produced by the classical antidepressant fluoxetine. In addition, we have shown that its antidepressant-like effect is dependent on its interaction with the serotonergic (5-HT_{1A}, 5-HT_{2A} and 5-HT₃ receptors), noradrenergic (α_1 and α_2 -receptors) and dopaminergic (D₁ and D₂ receptors) systems. Thus, our results suggest that the extract from *S. molle* shares with established antidepressants some pharmacological effects, at least at a preclinical level.

Acknowledgement

The present study was supported by a grant from FAPESC-SC, CNPq and CAPES (Brazil). We thank Dr. Daniel B. Falkenberg for identifying the specie of *S. molle*.

References

- Barauna SC, Kaster MP, Heckert BT, Nascimento KS, Rossi FM, Teixeira EH, et al. Antidepressant-like effect of lectin from *Canavalia brasiliensis* (ConBr) administered centrally in mice. *Pharmacol Biochem Behav* 2006;85:160–9.
- Barrachina MD, Bello R, Martínez-Cuesta MA, Primo-Yúfera E, Espluges J. Analgesic and central depressor effects of the dichloromethanol extract from *Schinus molle* L. *Phytother Res* 1997;11:317–9.
- Bello R, Barrachina MD, Moreno L, Primo-Yúfera E, Espluges J. Effects on arterial blood pressure of the methanol and dichloromethanol extracts from *Schinus molle* L. in rats. *Phytother Res* 1996;10:634–5.
- Bello R, Beltrán B, Moreno L, Calatayud S, Primo-Yúfera E, Espluges J. In vitro pharmacological evaluation of the dichloromethanol extract from *Schinus molle* L. *Phytother Res* 1998;12:523–5.
- Bilia AR, Gallori S, Vincieri FF. St. John's wort and depression. Efficacy, safety and tolerability—an update. *Life Sci* 2002;70:3077–96.
- Cryan JF, O'Leary OF, Jin S, Friedland JC, Ouyang M, Hirsch BR, et al. Norepinephrine-deficient mice lack responses to antidepressant drugs, including selective serotonin reuptake inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:8186–91.
- Cryan JF, Mombereau C, Vassout A. The tail suspension test as a model for assessing antidepressant activity: review of pharmacological and genetic studies in mice. *Neurosci Biobehav Rev* 2005;29:571–625.
- Dailly E, Chenu F, Renard CE, Bourin M. Dopamine, depression and antidepressants. *Fundam Clin Pharmacol* 2004;18:601–7.
- D'Aquila PS, Collu M, Gessa GL, Serra G. The role of dopamine in the mechanism of action of antidepressant drugs. *Eur J Pharmacol* 2000;405:365–73.
- Deakin JF. 5-HT₂ receptors, depression and anxiety. *Pharmacol Biochem Behav* 1988;29:819–20.
- Dziedzicka-Wasylewska M, Kolasiewicz W, Rogoz Z, Margas W, Maj J. The role of dopamine D₂ receptor in the behavioral effects of imipramine—study with the use of antisense oligonucleotides. *J Physiol Pharmacol* 2000;51:401–9.
- Eisensamer B, Rammes G, Gimpl G, Shapa M, Ferrari U, Hapfelmeier G, et al. Antidepressants are functional antagonists at the serotonin type 3 (5-HT₃) receptor. *Mol Psychiatry* 2003;12:994–1007.
- Elhwuegi AS. Central monoamines and their role in major depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2004;28:435–51.
- Gavioli EC, Vaughan CW, Marzola G, Guerrini R, Mitchell VA, Zucchini S, et al. Antidepressant-like effects of the nociceptin/orphanin FQ receptor antagonist UFP-101: new evidence from rats and mice. *Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol* 2004;369:547–53.
- Hensler JG. Differential regulation of 5-HT_{1A} receptors—G protein interactions in brain following chronic antidepressant administration. *Neuropsychopharmacology* 2002;26:565–73.
- Ishihara K, Sasa M. Potentiation of 5-HT₃ receptor functions in the hippocampal CA1 region of rats following repeated electroconvulsive shock treatments. *Neurosci Lett* 2001;307:37–40.
- Kaster MP, Santos ARS, Rodrigues ALS. Involvement of 5-HT_{1A} receptors in the antidepressant-like effect of adenosine in the mouse forced swimming test. *Brain Res Bull* 2005;67:53–61.
- Khisti RT, Chopde CT. Serotonergic agents modulate antidepressant-like effect of the neurosteroid 3 α -hydroxy-5 α -pregnan-20-one in mice. *Brain Res* 2000;865:291–300.
- Kos T, Popik P, Pietraszek M, Schäfer D, Danysz W, Dravolina O, et al. Effect of 5-HT₃ receptor antagonist MDL 72222 on behaviors induced by ketamine in rats and mice. *Eur Neuropsychopharmacol* 2006;16:297–310.
- Linde K, Knüppel L. Large-scale observational studies of hypericum extracts in patients with depressive disorders—a systematic review. *Phytotherapy* 2005;12:148–57.
- Mantovani M, Pértile R, Calixto JB, Santos ARS, Rodrigues ALS. Melatonin exerts an antidepressant-like effect in the tail suspension test in mice: evidence for involvement of N-methyl-D-aspartate receptors and the L-arginine-nitric oxide pathway. *Neurosci Lett* 2003;343:1–4.
- Millan MJ. The role of monoamines in the actions of established and “novel” antidepressant agents: a critical review. *Eur J Pharmacol* 2004;500:371–84.
- Mitani H, Shirayama Y, Yamada T, Kawahara R. Plasma levels of homovanillic acid, 5-hydroxyindoleacetic acid and cortisol, and serotonin turnover in depressed patients. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2006;30:531–4.
- Nestler EJ, Barrot M, DiLeonem RJ, Eisch AJ, Gold SJ, Monteggia LM. Neurobiology of depression. *Neuron* 2002;34:13–25.
- O'Neill MF, Conway MW. Role of 5-HT_{1A} 5-HT_{1B} receptors in the mediation of behavior in the forced swim test in mice. *Neuropsychopharmacology* 2001;24:391–8.
- Olafsson K, Jaroszewski JW, Smitt UW, Nyman U. Isolation of angiotensin converting enzyme (ACE) inhibiting triterpenes from *Schinus molle*. *Planta Medica* 1997;63:352–5.
- Papakostas GI. Dopaminergic-based pharmacotherapies for depression. *Eur Neuropsychopharmacol* 2006;16:391–402.
- Pozzo-Balbi T, Nobile L, Scapini G, Cini M. The triterpenoid acids of *Schinus molle*. *Phytochemistry* 1978;17:2107–10.
- Quiroga EN, Sampietro AR, Vattuone MA. Screening antifungal activities of selected medicinal plants. *J Ethnopharmacol* 2001;74:89–96.
- Redrobe JP, Bourin M. Partial role of 5-HT₂ and 5-HT₃ receptors in the activity of antidepressants in the mouse forced swimming test. *Eur J Pharmacol* 1997;325:129–35.
- Redrobe JP, Bourin M, Colombel MC, Baker GB. Dose-dependent noradrenergic and serotonergic properties of venlafaxine in animal models indicative of antidepressant activity. *Psychopharmacology* 1998a;138:1–8.
- Redrobe JP, Bourin M, Colombel MC, Baker GB. Psychopharmacological profile of the selective serotonin reuptake inhibitor, paroxetine: implication of noradrenergic and serotonergic mechanisms. *J Psychopharmacol* 1998b;12:348–55.
- Renard CE, Fiocco AJ, Clenet F, Hascoët M, Bourin MS. Is dopamine implicated in the antidepressant-like effects of selective serotonin reuptake inhibitors in the mouse forced swimming test? *Eur Neuropsychopharmacol* 2001;11:208–9.
- Rodrigues ALS, Silva GL, Matteussi AS, Fernandes E, Miguel O, Yunes RA, et al. Involvement of monoaminergic system in the antidepressant-like effect of the hydroalcoholic extract of *Siphocampylus verticillatus*. *Life Sci* 2002;70:1347–58.
- Ruffa MJ, Ferraro G, Wgner ML, Calcagno ML, Campos RH, Cavallaro L. Cytotoxic effect of Argentine medicinal plant extracts on human hepatocellular carcinoma cell line. *J Ethnopharmacol* 2002;79:335–9.
- Schmourlo G, Mendonça-Filho RR, Alviano CS, Costa SS. Screening of antifungal agents using ethanol precipitation and bioautography of medicinal and food plants. *J Ethnopharmacol* 2005;96:563–8.
- Sher L, Mann JJ, Traskman-Bendz L, Winchel R, Huang YY, Fertuck E, et al. Lower cerebrospinal fluid homovanillic acid levels in depressed suicide attempters. *J Affect Disord* 2006;90:83–9.
- Steru L, Chermat R, Thierry B, Simon P. The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. *Psychopharmacology* 1985;85:367–70.
- Taylor L. The healing power of rainforest herbs. A Guide to Understanding and Using Herbal Medicinals. New York: Square One Publishers; 2005.
- Viana A, Rego J, Poser G, Ferraz A, Heckler AP, Costentin J, et al. The antidepressant-like effect of *Hypericum caprifoliatum* Cham & Schlecht (Guttiferae) on forced swimming test results from an inhibition of neuronal monoamine uptake. *Neuropharmacology* 2005;49:1042–52.

- Wahrens J, Gerlach J. Bromocriptine and imipramine in endogenous depression. A double-blind controlled trial in out-patients. *J Affect Disord* 1981;3:193–202.
- Wong M, Licinio J. Research and treatment approaches to depression. *Nat Rev Neurosci* 2001;2:343–51.
- Whiskey E, Werneke U, Taylor D. A systematic review and meta-analysis of *Hypericum perforatum* in depression: a comprehensive clinical. *Int Clin Psychopharmacol* 2001;16:239–52.
- Yamada J, Sugimoto Y, Yamada S. Involvement of dopamine receptors in the anti-immobility effects of dopamine re-uptake inhibitors in the forced swimming test. *Eur J Pharmacol* 2004;504:207–11.
- Yueqin Z, Recio MC, Mánez S, Giner RM, Cerdá-Nicolás M, Ríos J. Isolation of two triterpenoids and a biflavanone with anti-inflammatory activity from *Schinus molle* fruits. *Planta Med* 2003;69:893–8.
- Zhang Z. Therapeutic effects of herbal extracts and constituents in animal models of psychiatric disorders. *Life Sci* 2004;75:1659–99.
- Zomkowsk ADE, Rosa AO, Lin J, Santos ARS, Calixto JB, Rodrigues ALS. Evidence for serotonin receptor subtypes involvement in agmatine antidepressant-like effect in the mouse forced swimming test. *Brain Res* 2004;253–63.