



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA E FARMACOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Vânia Ramos Sela

EFEITO DE LIGANTES SEROTONINÉRGICOS E DA XANTONA
OBTIDA DE *KIELMEYERA CORIACEA* MICROINJETADOS NO
NÚCLEO MEDIANO DA RAFE DE RATOS SUBMETIDOS A
TESTES COMPORTAMENTAIS

Maringá
2007

Vânia Ramos Sela

EFEITO DE LIGANTES SEROTONINÉRGICOS E DA
XANTONA OBTIDA DE *KIELMEYERA CORIACEA*
MICROINJETADOS NO NÚCLEO MEDIANO DA RAFE DE
RATOS SUBMETIDOS A TESTES COMPORTAMENTAIS

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, área de concentração em Produtos Naturais e Sintéticos biologicamente ativos da Universidade Estadual de Maringá para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof. Dra. Elisabeth A. Audi

Maringá

2007

Ao meu marido Douglas, a quem tanto amo e
aos meus pais Idemar e Vanderci,
pelo amor e dedicação incondicionais.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela graça da vida e por me fortalecer em cada momento.

A minha orientadora, Prof. Dra. Elisabeth A. Audi pela oportunidade, incentivo, compreensão e paciência. Lembrarei com carinho de seus ensinamentos por toda a vida.

Ao meu marido, Douglas, por sempre confiar em meus sonhos, me ajudando a torná-los realidade. Sem sua compreensão, companheirismo e amor, eu nunca teria concluído este trabalho.

Aos meus pais, Idemar e Vanderci, que são para mim muito mais do que eu conseguiria descrever em palavras, pela dedicação, carinho e apoio em todos os momentos de minha vida, ensinando-me a persistência e honestidade.

Ao meu sogro Ruy e sogra Mércia, pelo incentivo e ajuda em todo momento.

Aos meus irmãos, Francis e Vanessa, por sempre me auxiliarem em tudo que precisei, não apenas nesta, mas em todas as fases de minha vida e aos meus cunhados Vilma, Marcelo, Suellen e Márcio pela amizade e compreensão.

Aos meus amados sobrinhos Ana Flávia, João Victor e Jéssica, por tornarem minha vida mais feliz, mostrando que simplicidade e amor devem estar presentes sempre.

A Simoni, minha amiga fiel e companheira em todos os momentos, pela paciência e dedicação, essencial não só na realização deste trabalho, mas também em todos os anos de amizade.

Aos meus amigos de laboratório, Fernanda, Juliana, Leandro, Sivonei, Carla, Marcela, Mônica, Alessandra, Ivan e Carol, que sempre com alegria, companheirismo e responsabilidade me auxiliaram na realização deste trabalho.

Ao Marcos, Carlos e Solidalva, não apenas pelo apoio técnico, mas também pela amizade tornando o trabalho ainda mais agradável.

Ao professor Diógenes A. G. Cortez, por gentilmente fornecer a xantona isolada.

A Prof. Dra. Estefânia e a Prof. Dra. Rosângela pelo auxílio na análise estatística.

A Helena e demais funcionários, bem como todos os professores, e alunos do mestrado em Ciências Farmacêuticas, que contribuíram com o trabalho.

A CAPES e PPG pelo apoio financeiro.

RESUMO

Neurônios serotoninérgicos que se originam do núcleo mediano da rafe (NMR) estão envolvidos na etiologia e tratamento da depressão. Auto-receptores inibitórios 5-HT_{1A} localizados no NMR e NDR, regulam a taxa de disparos neuronais, controlando a atividade serotoninérgica cerebral. A administração crônica do extrato hidroetanólico (EH) e da fração diclorometano (DcM) de caule, mas não de folhas de *Kielmeyera coriacea* produzem efeito anti-imobilidade no teste do nado forçado (TNF) e interagem com ligantes de receptores 5-HT_{1A}, sugerindo envolvimento da neurotransmissão serotoninérgica neste efeito. Estudos fitoquímicos revelaram a presença da 1,3,7-trihidroxi-2-(3-metilbut-2-enil)-xantona apenas nos EH e fração DcM de caule de *Kielmeyera coriacea*, sugerindo que esta xantona pode ser a responsável pelo efeito observado no TNF. Os objetivos deste trabalho foram: 1- verificar o envolvimento dos neurônios serotoninérgicos do NMR na modulação da imobilidade produzida no TNF e da atividade locomotora observada no teste do campo aberto (TCA), através da microinjeção intra-NMR do agonista seletivo 5-HT_{1A}, 8-OHDPAT, e do antagonista seletivo 5-HT_{1A}, Way₁₀₀₆₃₅, em ratos; 2- verificar o efeito da 1,3,7-trihidroxi-2-(3-metilbut-2-enil)-xantona microinjetada intra-NMR, e sua interação com os ligantes de receptores 5HT_{1A}, Way₁₀₀₆₃₅ e 8 -OHDPAT. O modelo experimental envolveu ratos Wistar machos (55 dias), tratados intra-NMR com 8-OHDPAT (0,2; 0,4; 0,6; 1,2; 2,5; 5,0 µg), Way₁₀₀₆₃₅ (0,1; 0,2; 0,4; 1,2; 2,5; 5,0 µg) ou xantona (0,1; 0,2; 0,3 ng) submetidos ao TNF e ao TCA. Em uma segunda etapa foram realizados os tratamentos associados de Way₁₀₀₆₃₅ (2,5 ou 5,0 µg) e 8-OHDPAT (5,0 µg), e de Way₁₀₀₆₃₅ (2,5 ou 5,0 µg) ou 8-OHDPAT (5,0 µg) e xantona (0,2 ou 0,3 ng, respectivamente). O TNF foi sensível em detectar redução e aumento no tempo de imobilidade produzidos por Way₁₀₀₆₃₅ (2,5 µg) e 8-OHDPAT (5,0 µg)

respectivamente, microinjetados intra-NMR, mostrando envolvimento dos neurônios serotoninérgicos do NMR neste efeito. O Way₁₀₀₆₃₅ reverteu o aumento no tempo de imobilidade produzido pelo 8-OHDPAT, mostrando a participação de receptores 5-HT_{1A}. A xantona (0,3 ng) reduziu o tempo de imobilidade no TNF, de forma semelhante ao Way₁₀₀₆₃₅, e interagiu com o antagonista, mostrando envolvimento dos neurônios serotoninérgicos do NMR em seu efeito e sugerindo que poderá ser um protótipo de droga a ser utilizada em tratamentos de depressão. No TCA, houve alteração apenas no estudo de associação de drogas, onde Way₁₀₀₆₃₅ produziu uma redução na atividade locomotora e interagiu com o 8-OHDPAT, sugerindo participação dos neurônios serotoninérgicos do NMR na locomoção.

Palavras-chave: núcleo mediano da rafe, teste do nado forçado, serotonina, *Kielmeyera coriacea*, xantona, receptores 5-HT_{1A}.

ABSTRACT

The serotonin (5-HT) is involved in the etiology and expression of depression. The 5-HT_{1A} autoreceptors in the median and the dorsal raphe nuclei (MRN and DRN) regulate the 5-HT firing of neurons. Previous studies showed that a hydroethanolic extract (HE) of *K. coriacea* stems and its dichloromethane fraction (DcM), but not in the extract from its leaves constituent reduce immobility time in rats submitted to the forced swimming test (FST). Analysis by HPLC detected the presence of a large quantity of 1,3,7-trihydroxy-2-(3-methylbut-2-enyl)-xanthone only in the HE and the DcM from *K. coriacea* stems, suggesting that xanthone is related to the anti-immobility effect. The aim of the present study was to investigate the involvement of MRN serotonergic neurons, particularly mediated by somatodendritic 5-HT_{1A} autoreceptors located intra-MRN, on the effect of 1,3,7-trihydroxy-2-(3-methylbut-2-enyl)-xanthone, of 5-HT_{1A} receptor antagonist, Way₁₀₀₆₃₅ and of 5-HT_{1A} receptor agonist, 8-OHDPAT, in rats submitted to the FST and the open field test (OFT). Effects of intra-MRN microinjections (0.25 µl/30 s) of xanthone (0.1, 0.2 or 0.3 ng), Way₁₀₀₆₃₅ (0.1, 0.2, 0.4, 1.2, 2.5 or 5.0 µg) or (+) 8-OH-DPAT (0.2, 0.4, 0.6, 1.2, 2.5 or 5.0 µg) were evaluated in rats submitted to behavioral tests. Xanthone (0.3 ng) or Way₁₀₀₆₃₅ (2.5 µg) reduced, whereas (+) 8-OH-DPAT (5.0 µg) increased immobility time in the FST. Association of Way₁₀₀₆₃₅ and the ineffective dose of xanthone (0.2 ng) produced anti-immobility effect, showing a synergic effect. Way₁₀₀₆₃₅ blocked the increase in immobility time produced by (+) 8-OH-DPAT (5.0 µg) in the FST and reduced the number of crossings in the OFT. In conclusion, MRN neurons, through the 5-HT_{1A} autoreceptors, are involved in the xanthone and in the 5-HT_{1A} ligand effects in the FST and in locomotor activity in the OFT. Xanthone proved to be a prototype drug useful in treating depression.

Keywords: median raphe nucleus, forced swimming test, serotonin, *Kielmeyera coriacea*, xanthone, 5-HT_{1A} receptor.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - 1,3,7-trihidroxi-2-(3-metilbut-2-enil)-xantona.....	17
Figura 2 - Cirurgia estereotáxica.....	23
Figura 3 - Teste do nado forçado.....	25
Figura 4 - Localização da agulha de microinjeção intra-NMR de ratos.....	27

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Efeito da microinjeção intra-NMR de ligantes 5-HT _{1A} ou da xantona em ratos submetidos ao TNF e TCA.....	32
Tabela 2 – Efeito da associação entre Way ₁₀₀₆₃₅ e 8-OHDPAT, microinjetados intra-NMR de ratos submetidos ao TNF e TCA.....	33
Tabela 3 – Efeito da associação entre Way ₁₀₀₆₃₅ e a dose inefetiva da xantona, microinjetados intra-NMR de ratos submetidos ao TNF e TCA.....	34
Tabela 4 – Efeito da associação entre 8-OHDPAT e a dose efetiva da xantona, microinjetados intra-NMR de ratos submetidos ao TNF e TCA.....	35

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	11
2. OBJETIVOS.....	20
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	21
3.1 Coleta da planta.....	21
3.2 Obtenção do EH e fracionamento.....	21
3.3 Isolamento e identificação da 1,3,7-trihidroxi-2-(3-metilbut-2-enil)-xantona.....	21
3.4 Animais.....	22
3.5 Drogas utilizadas.....	22
3.6 Procedimento cirúrgico.....	22
3.7 Microinjeção no NMR.....	24
3.8 Testes comportamentais.....	25
3.8.1 Teste do Nado Forçado (TNF).....	25
3.8.2 Teste do Campo Aberto (TCA).....	26
3.9 Análise histológica.....	26
3.10 Análise estatística.....	27
4. RESULTADOS.....	28
4.1 Efeito da microinjeção intra-NMR de ligantes 5-HT_{1A} ou da xantona em ratos submetidos ao TNF e TCA.....	28
4.2 Efeito da associação entre Way₁₀₀₆₃₅ e 8-OHDPAT microinjetados intra-NMR em ratos submetidos ao TNF e TCA.....	28
4.3 Efeito da associação entre Way₁₀₀₆₃₅ e a dose inefetiva da xantona, microinjetados intra-NMR em ratos submetidos ao TNF e TCA.....	29
4.4 Efeito da associação entre 8-OHDPAT e a dose efetiva da xantona, microinjetados intra-NMR de ratos submetidos ao TNF e TCA.....	30
5. DISCUSSÃO.....	36
6. CONCLUSÕES.....	43
7. REFERÊNCIAS.....	44

1. INTRODUÇÃO

A depressão é uma doença comum e incapacitante, cujas estimativas mostram uma prevalência superior a 21% da população total em alguns países desenvolvidos (WONG; LICINIO, 2001).

O envolvimento da serotonina (5-HT) na etiologia e expressão dos distúrbios da ansiedade e depressão tem sido demonstrado em estudos pré-clínicos e clínicos através do tratamento com drogas que modulam este neurotransmissor (MAES; MELTZER, 1995). Anormalidades na atividade serotoninérgica de pacientes deprimidos têm sido observadas em diferentes etapas da neurotransmissão como na diminuição da disponibilidade do precursor l-triptofano, alterações na síntese, liberação, recaptação ou metabolismo de 5-HT ou ainda mau funcionamento de receptores pós-sinápticos (LUCKI, 1998).

A habilidade de compostos antidepressivos em aumentar a transmissão serotoninérgica é um componente crítico da sua atividade terapêutica (DELGADO et al., 1999).

Os neurônios contendo 5-HT são encontrados principalmente no mesencéfalo, ponte e bulbo, e estão confinados essencialmente às zonas mediana e paramediana dos núcleos da rafe.

Os núcleos dorsal e mediano da rafe (NDR e NMR) são as principais fontes de inervação serotoninérgica ascendente e cada um envia projeções a partir da rafe, para diferentes regiões límbicas do cérebro relacionadas aos distúrbios psiquiátricos. O NDR inerva, predominantemente, o córtex fronto-parietal, amígdala, septo lateral, núcleo acumbens, hipocampo ventral, mesencéfalo dorsal e núcleos hipotalâmicos. O NMR inerva predominantemente, o hipocampo dorsal, septo medial, núcleo acumbens e núcleos hipotalâmicos (LECHIN; VAN DER DIJS; HERNANDEZ-ADRIÁN,

2006). Confirmando as diferentes vias de projeção a partir dos NDR e NMR, McQuade e Sharp (1997) demonstraram que a estimulação elétrica do NDR produz aumento na liberação de 5-HT preferencialmente no córtex frontal, estriado, globo pálido e hipocampo ventral, enquanto a estimulação elétrica do NMR produz aumento na liberação de 5-HT, principalmente no hipocampo dorsal e ventral e septo medial.

A 5-HT produz seus efeitos através de uma variedade de receptores de membrana (HOYER; HANNON; MARTIN, 2002), que podem estar associados a respostas fisiológicas específicas que variam com a modulação da atividade neuronal e liberação de neurotransmissores promovendo alterações comportamentais (BARNES; SHARP, 1999).

Os receptores serotoninérgicos estão distribuídos em 7 famílias (5-HT₁₋₇), compreendendo um total de 14 subtipos de receptores distintos estruturalmente e farmacologicamente. Os receptores pertencentes à família 5-HT₁ são dispostos nos subtipos 1A, 1B (D), 1D, 1E e 1F (HOYER et al., 1994; BARNES; SHARP, 1999). A liberação de 5-HT, é regulada por receptores 5-HT_{1A} e 5-HT_{1B/1D} (ADELL; CELADA; ARTIGAS, 2001).

Os receptores 5-HT_{1A} estão localizados no soma e dendritos de neurônios dos núcleos da rafe, sendo denominados, auto-receptores somatodendríticos. Estes auto-receptores são inibitórios, regulando a taxa de disparos de neurônios serotoninérgicos e controlando a atividade da neurotransmissão serotoninérgica cerebral (CORRADETTI et al., 1996). Os receptores 5-HT_{1A} também estão presentes pós-sinápticamente em estruturas do sistema límbico, sendo excitatórios (DONG; DE MONTIGNY; BLIER, 1997; 1998).

Da mesma forma que os receptores 5-HT_{1A}, os receptores 5-HT_{1B}, estão localizados nos NMR e NDR do cérebro de roedores e são inibitórios, regulando negativamente a liberação de 5-HT, porém localizam-se nas terminações nervosas

serotoninérgicas. Os receptores 5-HT_{1B} são equivalentes aos 5-HT_{1D} encontrados em humanos (HOYER et al., 1994; BARNES; SHARP, 1999). Além disso, a inibição mediada por receptores 5-HT_{1B/1D} é mais significativa no NMR do que no NDR (ADELL; CELADA; ARTIGAS, 2001; LECHIN; VAN DER DIJS; HERNANDÉZ-ADRIÁN, 2006). Porém, os receptores 5-HT_{1A} parecem ser os principais envolvidos na via ascendente para o hipocampo, a partir do NMR (GRAEFF et al., 1995).

De acordo com a teoria de Deakin e Graeff (1991), diferentes vias serotoninérgicas e subtipos de receptores modulam os substratos neurais de depressão, pânico e ansiedade generalizada. As vias ascendentes serotoninérgicas que se originam do NDR e inervam principalmente amígdala e córtex frontal facilitam comportamentos de defesa ao estresse condicionado agudo, que se expressam em resposta a estímulos aversivos potenciais ou distais, como a esquivia inibitória. Por outro lado, vias serotoninérgicas que se originam do NDR e inervam principalmente o mesencéfalo dorsal inibem a fuga ativa ou luta que se expressam em resposta a perigos proximais. Disfunções nestas vias ascendentes serotoninérgicas podem gerar ansiedade generalizada ou pânico, respectivamente. Dessa forma, a liberação de 5-HT em terminais nervosos que chegam à amígdala, vindos do NDR, promove aumento da ansiedade aprendida, enquanto a liberação de 5-HT de terminais que partem do NDR e inervam o mesencéfalo dorsal inibe o medo incondicionado (pânico).

As vias que se originam do NMR e inervam principalmente o hipocampo promovem resistência ao estresse incondicionado crônico, através da desconexão entre processos psicobiológicos agradáveis e eventos aversivos, levando o animal ou indivíduo a levar uma vida normal apesar da adversidade persistente, e a depressão patológica sobrevêm quando este mecanismo falha e a liberação de 5-HT no hipocampo se encontra prejudicada (DEAKIN; GRAEFF, 1991).

A administração sistêmica de agonistas seletivos 5-HT_{1A} como o 8-OHDPAT, promove a ativação de auto-receptores inibitórios, reduzindo os disparos dos neurônios dos núcleos da rafe e conseqüentemente, a liberação de 5-HT nas áreas de projeção (HERVÁS et al., 1998). Em contrapartida, a administração sistêmica de antagonistas seletivos de receptores 5-HT_{1A}, aumenta os disparos dos neurônios da rafe e a liberação de 5-HT (FORNAL et al., 1999; HAJÓS et al., 2001).

Na literatura é descrito que agonistas seletivos 5-HT_{1A}, quando administrados sistemicamente expressam atividade ansiolítica e antidepressiva por agirem em receptores pré e pós-sinápticos, respectivamente. Quando testado em condições idênticas, o 8-OHDPAT é significativamente mais potente em modelos de ansiedade em comparação a modelos antidepressivos (DE VRY et al., 2004). O envolvimento destes receptores é claramente demonstrado em estudos com antagonistas seletivos 5-HT_{1A} (FLETCHER et al., 1996).

Os inibidores seletivos de recaptção de 5-HT (ISRS) são as drogas mais prescritas atualmente em muitos países, e da mesma forma que as demais classes de medicamentos antidepressivos, requerem um tempo de pelo menos duas semanas para o início do efeito terapêutico (ARTIGAS et al., 1996). No início do tratamento com ISRS, a estimulação dos auto-receptores 5HT_{1A}, produz uma redução na liberação de 5-HT nos terminais de projeção e esse mecanismo tem sido implicado como uma das causas do retardo no início de ação terapêutica destas drogas (STHAL, 1998; ARTIGAS et al., 2001). Entretanto, quando o tratamento é continuado há uma restauração nesta liberação (ARTIGAS et al., 1996). A fim de acelerar o início do efeito antidepressivo, diversos autores têm sugerido a utilização concomitante de drogas bloqueadoras dos auto-receptores inibitórios 5-HT_{1A} na tentativa de elevar, de forma mais precoce, os níveis de 5-HT nas regiões prosencefálicas. Neste sentido,

desde 1994, o ligante de β -adrenoreceptor e de receptor 5-HT_{1A/1B}, pindolol, tem sido empregado clinicamente para esse fim (ARTIGAS et al., 2001).

Estudos clínicos mostram que o pindolol reduz o tempo necessário para o aparecimento do efeito terapêutico e melhora a resposta em pacientes resistentes a antidepressivos (BLIER; BERGERON, 1995). Isso ocorre devido à potencialização da neurotransmissão serotoninérgica.

Em camundongos submetidos ao teste do nado forçado (TNF), o pindolol facilita o efeito anti-imobilidade/antidepressivo dos ISRS, fluoxetina, citalopram e fluvoxamina, mas não do antidepressivo tricíclico, imipramina ou do inibidor de recaptção de noradrenalina, maprotilina (REDROBE; MacSWEENEY; BOURIN, 1996). A administração sistêmica ou intra-NDR do antagonista seletivo 5-HT_{1A}, Way₁₀₀₆₃₅, também potencializa o aumento da liberação de 5-HT promovido por ISRS, em estudos de microdiálise (HJORTH; BENGTTSSON; MILANO, 1996; ROMERO; HERVÁS; ARTIGAS, 1996).

O TNF é um teste comportamental freqüentemente usado para avaliar o potencial e a eficácia de drogas antidepressivas em camundongos ou ratos (PORSOLT; BERIN; JALFRE, 1977; PORSOLT et al., 1978). Drogas antidepressivas reduzem o tempo de imobilidade no TNF sem aumentar a atividade locomotora no teste de campo aberto (TCA) (PORSOLT et al., 1979; LUCKI, 1997).

O modelo do nado forçado produz alterações nos níveis de 5-HT extracelulares em regiões específicas do cérebro, já que técnicas de microdiálise *in vivo* mostram aumento nos níveis de 5-HT no estriado e redução de 5-HT na amídala e no septo lateral de ratos expostos ao teste por 30 minutos. Essas distintas alterações nos níveis extracelulares de 5-HT podem estar mostrando alterações fisiológicas produzidas pelo teste, ou seja, o aumento de 5-HT extracelular detectado no estriado pode ser resultado de um componente locomotor, enquanto a sua redução na amídala e septo lateral, pode

estar relacionada com o “estado funcional depressivo” produzido fisiologicamente pelo teste, refletindo especificamente, um componente emocional do nado forçado (KIRBY; ALLEN; LUCKI, 1995).

Em pesquisas relacionadas à eficácia de fitoterápicos, inúmeras plantas medicinais têm demonstrado efeitos significativos sobre o sistema nervoso central (SNC), tais como o *Ginkgo biloba*, *Piper methysticum* (Kava-kava), *Valeriana officinalis* e o *Hypericum perforatum* (Erva de São João) que podem fornecer alternativas terapêuticas para o tratamento da doença de Alzheimer, ansiedade, insônia e depressão, respectivamente (CARLINI, 2003).

O consumo de diferentes plantas com fins medicinais cresce a cada ano em todo o mundo. Apesar disso, pesquisas que comprovem cientificamente suas propriedades farmacológicas e verifiquem sua toxicidade, visando o uso seguro e o controle da sua comercialização por órgãos oficiais, ainda são precários (VEIGA JUNIOR; PINTO; MACIEL, 2005).

Embora o Brasil possua uma extensa e diversificada flora que representa, aproximadamente, um terço do total mundial, ele não se destaca no mercado de fitoterápicos (YUNES; PEDROSA; CECHINEL FILHO, 2001).

A *Kielmeyera coriacea*, é uma planta encontrada no cerrado brasileiro pertencente à família Clusiaceae, a mesma do *Hypericum perforatum*. Estudos pré-clínicos e clínicos têm demonstrado atividade antidepressiva para o *H. perforatum*, comparável à de antidepressivos clinicamente estabelecidos (DE VRY et al., 1999; BRENNER et al., 2000).

O extrato hidroetanólico (EH) e a fração semi-purificada diclorometano (DcM) obtidas de caule, mas não de folhas de *Kielmeyera coriacea*, mostraram efeito anti-imobilidade em ratos submetidos ao TNF, da mesma forma que compostos antidepressivos (AUDI et al., 2002; MARTINS et al., 2004), sugerindo que os

constituintes químicos existentes na fração semi-purificada possam ser os mesmos responsáveis pelo efeito anti-imobilidade observado com o EH de caule de *Kielmeyera coriacea* (MARTINS et al., 2006). O tratamento associado de ligantes de receptores serotoninérgicos microinjetados no NDR de ratos tratados sistemicamente com o EH ou com a fração DcM de caule de *Kielmeyera coriacea* mostra interação entre extrato ou fração e os ligantes serotoninérgicos, sugerindo envolvimento da neurotransmissão serotoninérgica no efeito anti-imobilidade observado no TNF (GOULART et al., 2007; OTOBONE et al., 2007). Em adição, o EH de caule de *Kielmeyera coriacea* produz inibição de recaptação sinaptossomal de [³H] 5-HT, [³H] noradrenalina (NA) e [³H] dopamina (DA) dependente da concentração, com atividade preferencial sobre a 5-HT (GOULART et al., 2007). A inibição da recaptação destes neurotransmissores é um mecanismo de ação comum a muitos compostos antidepressivos.

A investigação fitoquímica do EH de folhas e caule de *Kielmeyera coriacea* resultou no isolamento e identificação de dez xantonas, dois triterpenos e um bifenil, e revelou a existência de diferenças químicas entre estas partes da planta. Dentre estas diferenças a de maior destaque foi a presença das xantonas 1,3,7-trihidroxi-2-(3-metilbut-2-enil)-xantona (Figura 1) e 1,3,5-trihidroxi-2-(3-metilbut-2-enil)-xantona, encontradas apenas no caule e não nas folhas (CORTEZ et al., 1998). Isso sugere que existe uma estreita relação entre a atividade anti-imobilidade observada para o EH e para a fração DcM de caule da *Kielmeyera coriacea* e a presença de xantonas na sua constituição.

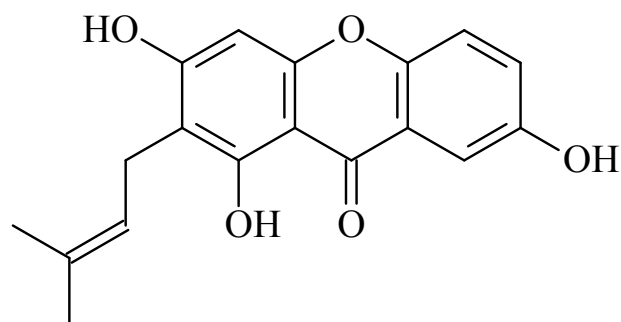


Figura 1: 1,3,7-trihidroxi-2-(3-metilbut-2-enil)-xantona

Extraído de Cortez et al., 1998

A microinjeção da 1,3,7-trihidroxi-2-(3-metilbut-2-enil)-xantona ou de antagonistas 5-HT_{1A} (Way₁₀₀₆₃₅ ou pindolol) no NDR, não alteram o tempo de imobilidade em ratos submetidos ao TNF. No entanto, o tratamento associado com antagonistas de receptores 5-HT_{1A} (Way₁₀₀₆₃₅ ou pindolol) e a mesma xantona reduziu significativamente o tempo de imobilidade, mostrando interação entre os compostos (MARTINS, 2005).

A xantona sintética [(R, S)-2-N-(6-cloro-2-xantonemetil)-amino-1-propanol] exerce efeito anti-imobilidade no TNF, reduz a atividade locomotora no TCA, e produz efeito anticonvulsivante no teste de convulsão induzido por picrotoxina (JASTRZEBSKA-WIESED et al., 2003). Outros estudos mostram que derivados hidroxilados sintéticos de xantona (OHISHI et al., 2000) e xantonas obtidas da *Gentiana kochiana*, uma planta utilizada popularmente para auxiliar na digestão e estimular o apetite (TOMIC et al., 2005), possuem a capacidade de inibir a enzima monoamina oxidase (MAO), mecanismo conhecido de uma classe de antidepressivos (inibidores da MAO), o que possibilita estabelecer uma relação entre xantonas e potencial de atividade antidepressiva.

A grande diversidade de constituintes presentes nas plantas medicinais permite que sua utilização não se limite apenas como fonte natural de fármaco, mas também como fonte de matéria-prima para obtenção de substâncias ativas isoladas ou de moléculas protótipo para desenvolvimento de fármacos (YUNES; PEDROSA; CECHINEL FILHO, 2001).

Existe no Brasil uma predominância de estudos realizados com extratos vegetais brutos ou frações obtidas de plantas medicinais (fitoterápicos), porém trabalhos envolvendo atividade farmacológica e toxicológica de princípios ativos puros são ainda pouco representativos (PINTO et al., 2002). No entanto, o uso de substâncias puras proporciona vantagens em relação aos produtos de composição complexa como composição química conhecida e ausência de qualquer outra substância ativa além daquela determinada, facilitando o controle da qualidade.

Reconhecida à importância dos receptores 5-HT_{1A} do NMR e seu envolvimento na etiologia, expressão e tratamento da depressão, o presente estudo buscou determinar o envolvimento dos neurônios do NMR de ratos na modulação da imobilidade produzida no TNF e atividade locomotora no TCA, através da microinjeção intra-NMR de ligantes serotoninérgicos, e verificar o efeito da 1,3,7-trihidroxi-2-(3-metilbut-2-enil)-xantona microinjetada intra-NMR e sua interação com ligantes específicos 5-HT_{1A}, em ratos submetidos aos mesmos testes comportamentais.

OBJETIVOS

1- Verificar o envolvimento dos neurônios serotoninérgicos do NMR na modulação da imobilidade produzida no TNF e da atividade locomotora observada no TCA, através da microinjeção intra-NMR do agonista seletivo 5-HT_{1A}, 8-OHDPAT, e do antagonista seletivo 5-HT_{1A}, Way₁₀₀₆₃₅, e de sua associação, em ratos.

2- Verificar o efeito da 1,3,7-trihidroxi-2-(3-metilbut-2-enil)-xantona microinjetada intra-NMR, e sua interação com os ligantes de receptores 5HT_{1A}, Way₁₀₀₆₃₅ e 8 -OHDPAT, em ratos submetidos aos testes comportamentais do nado forçado e campo aberto.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Coleta da planta

A *Kielmeyera coriacea*, foi coletada na região de Mogi Guaçu (S.P.) em julho de 1999. Uma amostra da espécie está depositada no herbário do Instituto Botânico do estado de São Paulo sob nº SP 298463.

3.2 Obtenção do EH e fracionamento

O caule de *Kielmeyera coriacea* foi exaustivamente extraído com etanol/água (9:1) a temperatura ambiente durante 7 dias. O solvente foi evaporado em evaporadores rotativos a pressão reduzida e após, o extrato foi liofilizado e armazenado em freezer. O EH foi fracionado em cromatografia de coluna a vácuo, obtendo-se seis frações, que também foram liofilizadas após a eliminação do solvente orgânico em evaporador rotatório. As frações ativas foram analisadas em cromatografia de camada delgada e fracionadas por cromatografia em gel de SEPHADEX[®] LH-20 utilizando-se como fase móvel sistemas isocráticos (CORTEZ et al., 1998).

3.3 Isolamento e identificação da 1,3,7-trihidroxi-2-(3-metilbut-2-enil)-xantona

A 1,3,7-trihidroxi-2-(3-metilbut-2-enil)-xantona foi isolada através de cromatografia líquida em coluna de fase reversa. Também foi identificada por métodos espectrométricos através da análise dos espectros e por comparação com os dados da literatura (CORTEZ et al., 1998).

3.4 Animais

Foram utilizados ratos Wistar, machos, pesando entre 230-250 g, agrupados em 4 animais por caixa, com livre acesso à água e ração. Os animais foram mantidos em um biotério com temperatura controlada a $23^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ com ciclo claro/escuro de 12 h (7:00-19:00 hs).

Os experimentos foram realizados após aprovação pelo Comitê de Ética Experimental Animal da Universidade Estadual de Maringá (Parecer n° 041/2004-CEEA).

3.5 Drogas utilizadas

R(+)-8-hidroxi-dipropilaminotetralina Hidrobrometo (**8-OHDPAT**), Sigma-RBI (Research Biochemicals International): agonista seletivo de receptor 5-HT_{1A} solubilizado em salina estéril.

N-[2-(4[2-Metoxifenil]-1Piperazinil)etil]-N-2-piridinilciclohexanecarboxamida (**Way100635**), Sigma-RBI (Research Biochemicals International): antagonista seletivo de receptor 5-HT_{1A} solubilizado em salina estéril.

1,3,7-trihidroxi-2-(3-metilbut-2-enil)-xantona, (**xantona**), obtida a partir do EH de caule de *Kielmeyera coriacea* solubilizada em salina estéril contendo tween 80 a 2% (veículo).

3.6 Procedimento cirúrgico

Os animais foram submetidos à cirurgia estereotáxica para implantação de cânulas (15 x 0.6 mm), de acordo com os parâmetros, previamente calculados a partir do Atlas de Paxinos e Watson (2005).

Após os ratos serem devidamente anestesiados com quetamina (70 mg/kg) e xilazina (12 mg/kg) por via intramuscular, foi realizado a tricotomia na região da

cabeça, e então os animais foram posicionados no aparelho estereotáxico. A assepsia e a administração do anestésico local, cloridrato de lidocaína subcutaneamente (1 ml/kg), foram realizadas na cabeça do rato. Após início da ação do anestésico local, o escalpo foi cortado com auxílio de uma tesoura. As bordas do corte cirúrgico foram mantidas abertas deixando a mostra o crânio do animal com os pontos de referência (bregma e lambda). Por fim, foi marcado com uma lapiseira de ponta fina a região onde o crânio deveria ser perfurado e, com o auxílio de uma broca odontológica em baixa velocidade, foi realizada a perfuração usando as seguintes coordenadas, a partir do bregma, de acordo com o atlas de Paxinos e Watson (2005): ântero-posterior = -7,6 mm, dorso-ventral = 6,9 mm e médio-lateral = 2,9 mm, com um ângulo de 22°. A cânula foi então implantada lentamente mantendo-se 2,0 mm acima do ponto de microinjeção desejado, o NMR, e fixada ao crânio do animal por meio de uma resina acrílica (JET) que cobre toda a área aberta. Para que a resina se fixasse e não se desprendesse durante o período de recuperação antes dos testes (5 a 6 dias), foi perfurado um ponto para inserção de um parafuso óptico do lado oposto ao ponto de inserção da cânula-guia. A cânula-guia foi selada com um fio de aço inox de mesmo comprimento, para protegê-la de obstrução, que só foi retirado no momento da microinjeção durante a sessão experimental.

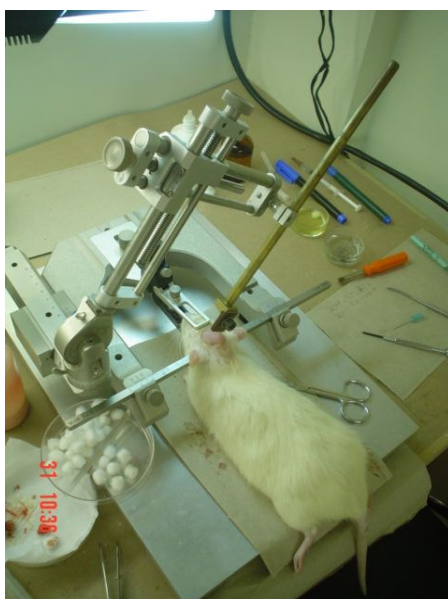


Figura 2: Cirurgia estereotáxica

Finalmente, foi administrado profilaticamente, como cuidado pós-operatório, 0,3 ml de pentabiótico veterinário reforçado (uma associação com cinco antibióticos de amplo espectro), por via intramuscular.

3.7 Microinjeção no NMR

As microinjeções foram realizadas com o auxílio de uma agulha Mizzy (17 mm) conectada a uma microseringa Hamilton de 10 μ l por meio de um tubo de polietileno (PE-10), cinco ou seis dias após a cirurgia. A agulha foi introduzida no interior da cânula-guia ultrapassando 2,0 mm desta, a fim de atingir o NMR. Com o auxílio de uma bomba de infusão, as microinjeções foram realizadas em tempo e volume constantes (0,25 μ l/30s), permanecendo a agulha por 30 s adicionais no sítio intra-encefálico, para evitar refluxo da solução injetada e permitir uma melhor difusão da droga. Os animais receberam sempre duas microinjeções, com intervalo de tempo entre elas de 10 min. O tempo entre a última injeção e os testes comportamentais também foi de 10 min.

Assim, para a realização da curva dose-efeito, o esquema de administração foi:

- salina + veículo (controle)
- 8-OHDPAT (0,2; 0,4; 0,6; 1,2; 2,5; 5,0 µg) + veículo
- Way₁₀₀₆₃₅ (0,1; 0,2; 0,4; 1,2; 2,5; 5,0 µg) + veículo
- salina + xantona (0,1; 0,2 ou 0,3 ng)

Para o tratamento associado de drogas:

- salina + veículo (controle)
- 8-OHDPAT 5,0 µg + veículo (8-OHDPAT 5,0 µg)
- Way₁₀₀₆₃₅ 2,5 ou 5,0 µg + veículo (Way₁₀₀₆₃₅ 2,5 ou 5,0 µg)
- salina + xantona 0,2 ou 0,3 ng (xantona 0,2 ou 0,3 ng)
- Way₁₀₀₆₃₅ 2,5 ou 5,0 µg + 8-OHDPAT 5,0 µg
- Way₁₀₀₆₃₅ 2,5 ou 5,0 µg + xantona 0,2 ng
- 8-OHDPAT 5,0 µg + xantona 0,3 ng

3.8 Testes Comportamentais

3.8.1 Teste do nado forçado (TNF)

No quinto e sexto dias após a cirurgia, os ratos foram individualmente forçados a nadar em um recipiente cilíndrico aberto (diâmetro 30 cm, altura 60 cm), contendo 45 cm de água a temperatura controlada ($25 \pm 1^\circ\text{C}$). O teste empregado foi essencialmente similar àquele descrito por Porsolt e colaboradores (1978), exceto pelo nível de água. O nível de água foi aumentado (45 cm) a fim de aumentar a sensibilidade do teste. Com esta modificação, os animais não tocam suas caudas no fundo do cilindro. Este procedimento é consistente com a prática de outros autores (DETKE; LUCKI, 1996), e é considerado o método atualmente padronizado. Os animais foram expostos a um pré-teste por 15 min, 24 h antes do teste do nado (5 min). O teste do nado foi gravado durante os 5 min para posterior medida do tempo de imobilidade observada pelo experimentador. Neste teste, cada animal é considerado

imóvel quando ele pára de nadar e permanece flutuando, fazendo somente movimentos suficientes necessários para manter sua cabeça acima da água. Após o teste os animais foram removidos da água, secados, e colocados nas gaiolas.



Figura 3: Teste do nado forçado

3.8.2 Teste do campo aberto (TCA)

É complementar ao TNF e avalia a atividade locomotora diferenciando efeito psicoestimulante de antidepressivo.

No quinto ou sexto dia após a cirurgia, os animais foram colocados individualmente no aparato do TCA, que consiste em uma caixa de madeira (100 X 100 cm) com 40 cm de altura, dividido em 25 quadrados idênticos. Durante um período de 5 min, o número de quadrados visitados (quatro patas colocadas no mesmo quadrado) foi contado para a avaliação da atividade locomotora. Duas luzes fluorescentes forneceram iluminação aérea difusa (200 lux no nível da arena) (Royce, 1977).

Os animais utilizados no TCA foram diferentes dos utilizados no TNF, já que o TNF é considerado um modelo estressor produzindo alterações neuroquímicas e neuroendócrinas, principalmente quanto a neurotransmissão serotoninérgica (KIRBY; ALLEN; LUCKI, 1995), podendo vir a interferir nos resultados de locomoção.

3.9 Análise histológica

Para verificar a posição exata da cânula no animal, após o término dos experimentos, os animais foram anestesiados com tiopental e posteriormente sacrificados com éter, para realização da perfusão transcardíaca com solução salina, seguida de formol 10%. Os encéfalos foram retirados e mantidos em formol 10% por cerca de 5 dias. Após este período, foram congelados e então foram realizadas secções coronais de 50 μm de espessura, com o auxílio de um micrótomo de congelamento. Os cortes foram preparados em lâminas de microscopia previamente gelatinizadas, e posteriormente foram corados com vermelho neutro para visualização em microscópio óptico do local da microinjeção. Só foram considerados, na análise estatística, ratos nos quais a agulha de microinjeção estava localizada dentro do NMR (PAXINOS; WATSON, 2005).



Figura 4: Localização da agulha de microinjeção intra-NMR de ratos

3.10 Análise estatística

Os resultados foram apresentados como média \pm EPM. Nos estudos da curva dose-efeito dos ligantes 5-HT_{1A} e da xantona, a análise estatística foi realizada através

de ANOVA de um fator seguida pelo teste de Dunnett, utilizando o programa GraphPad Prism versão 4,0.

No estudo das associações entre ligantes e dos ligantes com a xantona, a análise estatística foi realizada através de ANOVA de dois fatores, onde foram observados o fator 1 (primeira microinjeção), fator 2 (segunda microinjeção) e a interação entre eles. Quando obtido um valor de F significativo, foi realizado a comparação entre os grupos através do teste de contraste. As diferenças significativas obtidas pelo teste de contraste foram indicadas através de símbolos nas tabelas. Os dados foram analisados com o auxílio do programa Statistica 7,0. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos para valores de $p \leq 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1 Efeito da microinjeção intra-NMR de ligantes 5-HT_{1A} ou de xantona em ratos submetidos ao TNF e TCA.

A tabela 1 mostra os resultados obtidos com a microinjeção intra-NMR (0,25µl/30seg) de salina, agonista seletivo de receptores 5-HT_{1A}, 8-OHDPAT (0,2; 0,4; 0,6; 1,2; 2,5 e 5,0 µg), antagonista seletivo de receptores 5-HT_{1A}, Way₁₀₀₆₃₅ (0,1; 0,2; 0,4; 1,2; 2,5 e 5,0 µg) seguidos de veículo ou salina seguida de xantona (0,1; 0,2 ou 0,3 ng), para avaliação do tempo de imobilidade no TNF ou para verificação do número de cruzamentos no TCA.

ANOVA de um fator seguida pelo teste de Dunnett, mostrou que a microinjeção de 8-OHDPAT, na dose de 5,0 µg aumentou [$F_{(6,69)} = 3,721$; $p < 0,01$] o tempo de imobilidade, enquanto a microinjeção de Way₁₀₀₆₃₅, na dose de 2,5 µg

[$F_{(6,63)}= 3,910$); $p<0,01$], e de xantona na dose de 0,3 ng [$F_{(3,38)}= 9,463$; $p<0,001$], reduziram o tempo de imobilidade quando comparados ao grupo controle ($*p<0,05$). O número de cruzamentos observados no TCA não foi alterado significativamente com a microinjeção de 8-OHDPAT, Way₁₀₀₆₃₅ ou xantona [$F_{(6,65)}= 2,270$; $p>0,05$], [$F_{(6,65)}= 2,842$; $p>0,05$] e [$F_{(3,38)}= 3,061$; $p>0,05$], respectivamente, comparados ao grupo controle.

4.2 Efeito da associação entre Way₁₀₀₆₃₅ e 8-OHDPAT microinjetados intra-NMR em ratos submetidos ao TNF e TCA.

A tabela 2 mostra os resultados da microinjeção intra-NMR (0,25µl/30seg) de veículo ou do agonista 5-HT_{1A}, 8-OHDPAT 5,0 µg, em ratos pré-tratados com uma microinjeção intra-NMR (0,25µl/30seg) de salina, ou do antagonista 5-HT_{1A}, Way₁₀₀₆₃₅ 2,5 ou 5,0 µg e submetidos ao TNF ou TCA.

ANOVA de dois fatores mostrou efeito significativo para a microinjeção do Way₁₀₀₆₃₅ [$F_{(2,63)}= 8,176$; $p<0,001$], do 8-OHDPAT 5,0 µg [$F_{(1,63)}= 10,150$; $p<0,01$] e interação significativa para a associação Way₁₀₀₆₃₅ + 8-OHDPAT 5,0 µg [$F_{(2,63)}= 3,717$; $p<0,05$]. O teste de contraste indicou diferença significativa entre o Way₁₀₀₆₃₅ 2,5 µg e o controle ($^{++}p<0,01$), e ambas as associações de Way₁₀₀₆₃₅ (2,5 e 5,0 µg) + 8-OHDPAT 5,0 µg ($**p<0,01$) foram diferentes de 8-OHDPAT 5,0 µg, mostrando que o efeito significativo observado para o Way₁₀₀₆₃₅ em ANOVA, corresponde à dose de 2,5 µg e ainda, que ambas as doses de Way₁₀₀₆₃₅ interagem significativamente com o 8-OHDPAT 5,0 µg, revertendo o aumento do tempo de imobilidade promovido pelo agonista.

Na avaliação da atividade locomotora, medida através do número de cruzamentos no TCA, ANOVA de dois fatores não mostrou efeito para as

microinjeções de Way₁₀₀₆₃₅ [$F_{(2,60)} = 1,353$; $p > 0,05$] ou 8-OHDPAT 5,0 µg [$F_{(1,60)} = 0,012$; $p > 0,05$], porém mostrou interação para Way₁₀₀₆₃₅ + 8-OHDPAT 5,0 µg [$F_{(2,60)} = 4,704$; $p < 0,05$]. O teste de contraste indicou diferença entre a associação Way₁₀₀₆₃₅ 5,0 µg + 8-OHDPAT 5,0 µg e 8-OHDAPT 5,0 µg ($*p < 0,05$), mostrando que a associação aumentou o número de cruzamentos, porém os valores foram semelhantes aos do grupo controle.

4.3 Efeito da associação entre Way₁₀₀₆₃₅ e a dose inefetiva da xantona, microinjetados intra-NMR de ratos submetidos ao TNF e TCA.

A tabela 3 mostra os resultados da microinjeção intra-NMR (0,25µl/30seg) de veículo ou xantona na dose inefetiva (0,2 ng), em ratos pré-tratados com microinjeção intra-NMR (0,25µl/30seg) de salina ou do antagonista 5-HT_{1A}, Way₁₀₀₆₃₅ nas doses de 2,5 ou 5,0 µg e submetidos ao TNF e TCA.

ANOVA de dois fatores mostrou efeito significativo para a microinjeção do Way₁₀₀₆₃₅ [$F_{(2,60)} = 10,300$; $p < 0,001$], bem como uma interação significativa para a associação Way₁₀₀₆₃₅ + xantona 0,2 ng [$F_{(2,60)} = 4,141$; $p < 0,05$], porém não mostrou efeito significativo para a xantona 0,2 ng [$F_{(1,60)} = 0,673$; $p > 0,05$]. O teste de contraste indicou diferença significativa entre Way₁₀₀₆₃₅ 2,5 µg e o controle ($^{+++}p < 0,001$), e ambas as associações de Way₁₀₀₆₃₅ (2,5 e 5,0 µg) + xantona 0,2 ng foram diferentes da xantona 0,2 ng ($**p < 0,01$), mostrando que o efeito significativo observado para o Way₁₀₀₆₃₅ em ANOVA, corresponde à dose de 2,5 µg e ainda, que ambas as doses de Way₁₀₀₆₃₅ interagem significativamente com a xantona 0,2 ng, facilitando o aparecimento do efeito anti-imobilidade.

Na avaliação da atividade locomotora, ANOVA de dois fatores mostrou efeito para a microinjeção de Way₁₀₀₆₃₅ [$F_{(2,59)} = 7,634$; $p < 0,01$], porém não para a xantona 0,2 ng [$F_{(1,59)} = 0,036$; $p > 0,05$], bem como não mostrou interação para Way₁₀₀₆₃₅ +

xantona 0,2 ng [$F_{(2,59)} = 0,298$; $p > 0,05$]. O teste de contraste indicou diferença significativa entre ambas as doses de Way₁₀₀₆₃₅ (2,5 e 5,0 μg) e o controle ($^+ p < 0,05$), mostrando que o efeito significativo observado em ANOVA, corresponde as duas doses do antagonista.

4.4 Efeito da associação entre 8-OHDPAT e a dose efetiva da xantona, microinjetados intra-MR de ratos submetidos ao TNF e TCA.

A tabela 4 mostra os resultados da microinjeção intra-NMR (0,25 μl /30seg) de veículo ou xantona na dose efetiva (0,3 ng), em ratos pré-tratados com microinjeção intra-NMR (0,25 μl /30seg) de 8-OHDPAT (5,0 μg) ou salina, e submetidos ao TNF e TCA.

ANOVA de dois fatores mostrou um efeito significativo no tempo de imobilidade para as microinjeções de 8-OHDPAT 5,0 μg [$F_{(1,41)} = 10,086$; $p < 0,01$] e xantona 0,3 ng [$F_{(1,41)} = 17,280$; $p < 0,001$], mas não revelou interação entre os compostos [$F_{(1,41)} = 0,231$; $p > 0,05$] no TNF. Na análise do número de cruzamentos no TCA, ANOVA de dois fatores não mostrou alteração significativa nem para o agonista [$F_{(1,43)} = 3,849$; $p > 0,05$], nem para a xantona [$F_{(1,43)} = 3,290$; $p > 0,05$], bem como não mostrou interação entre eles [$F_{(1,43)} = 1,317$; $p > 0,05$].

Tabela 1: Efeito da microinjeção intra-NMR de ligantes 5-HT_{1A} ou de xantona em ratos submetidos ao TNF e TCA

Tratamento	Tempo de imobilidade (s)	Número de cruzamentos
Controle	179,2±7,9	164,6±10,7
8-OHDPAT (µg)		
0,2	195,9±9,1	172,8±10,3
0,4	185,6±12,9	152,4±12,3
0,6	157,1±12,3	127,6±11,8
1,2	192,5±11,4	136,0±13,1
2,5	164,4±10,2	156,6±12,4
5,0	217,5±9,6*	126,1±11,8
Way ₁₀₀₆₃₅ (µg)		
0,1	183,3±9,2	145,0±11,3
0,2	206,3±11,9	132,5±8,8
0,4	196,3±11,3	168,1±7,1
1,2	182,4±13,3	129,5±14,9
2,5	139,9±11,2*	133,1±9,7
5,0	189,0±11,8	126,3±8,4
Xantona (ng)		
0,1	210,3±11,0	135,6±6,3
0,2	207,2±9,8	164,5±6,4
0,3	146,8±9,1*	172,9±10,7

Média ± EPM do tempo de imobilidade no TNF e atividade locomotora no TCA, observados após microinjeção (0,25µl/30s) de salina, 8-OHDPAT (0,2; 0,4; 0,6; 1,2; 2,5 ou 5,0 µg), Way₁₀₀₆₃₅ (0,1; 0,2; 0,4; 1,2; 2,5 ou 5,0 µg) seguidos de veículo ou salina seguida de xantona (0,1, 0,2 ou 0,3 ng) no NMR de ratos (n = 8-16). *p<0,05 comparado com o controle (teste de Dunnett).

Tabela 2: Efeito da associação entre Way₁₀₀₆₃₅ e 8-OHDPAT microinjetados intra-NMR em ratos submetidos ao TNF e TCA.

Way ₁₀₀₆₃₅ (µg)	8-OHDPAT (µg)			
	0,0		5,0	
	TNF	TCA	TNF	TCA
0,0	181,5±9,4	164,6±13,2	225,1±9,8	126,1±10,9
2,5	139,9 ±10,2 ⁺⁺	133,1±13,2	186,7 ±10,2 ^{**}	123,0±13,2
5,0	189,0±12,5	126,2±15,5	181,2 ±11,1 ^{**}	171,3±14,6 [*]

Média ± EPM do tempo de imobilidade obtido no TNF e número de cruzamentos no TCA, observados após microinjeção intra-NMR (0,25µl/30s) de salina ou Way₁₀₀₆₃₅ (2,5 ou 5,0 µg) seguida de veículo ou 8-OHDPAT (5,0 µg), em ratos (n = 8-16). ⁺⁺p<0,01 comparado com Way₁₀₀₆₃₅ 0,0 + 8-OHDPAT 0,0; *p<0,05 e **p<0,01 comparado com Way₁₀₀₆₃₅ 0,0 + 8-OHDPAT 5,0 µg (teste de contraste).

Tabela 3: Efeito da associação entre Way₁₀₀₆₃₅ e a dose inefetiva da xantona, microinjetados intra-NMR de ratos submetidos ao TNF e TCA.

Way ₁₀₀₆₃₅ (µg)	Xantona (ng)			
	0,0		0,2	
	TNF	TCA	TNF	TCA
0,0	185,0±9,6	164,6±10,4	207,2±11,4	164,5±10,0
2,5	133,3±10,9 ⁺⁺⁺	133,1±10,4 ⁺	164,5±9,6 ^{**}	143,7±10,0
5,0	189,0±12,7	126,2±12,2 ⁺	157,9±12,0 ^{**}	120,7±10,4

Média ± EPM do tempo de imobilidade obtido no TNF e atividade locomotora no TCA, observados após microinjeção (0,25µl/30s) intra-NMR de salina ou Way₁₀₀₆₃₅ (2,5 ou 5,0 µg) seguido de veículo ou xantona (0,2 ng), em ratos (n = 8-14). ⁺p<0,05 e ⁺⁺⁺p<0,001 comparado com Way₁₀₀₆₃₅ 0,0 + xantona 0,0; ^{**}p<0,01 comparado com Way₁₀₀₆₃₅ 0,0 + xantona 0,2 (teste de contraste).

Tabela 4: Efeito da associação entre 8-OHDPAT e a dose efetiva da xantona, microinjetados intra-NMR de ratos submetidos ao TNF e TCA.

8-OHDPAT (μg)	Xantona (ng)			
	0,0		0,3	
	TNF	TCA	TNF	TCA
0,0	186,1 \pm 10,3	164,6 \pm 12,6	146,8 \pm 12,3	172,9 \pm 13,2
5,0	225,1 \pm 10,0	126,1 \pm 10,4	175,6 \pm 11,2	162,8 \pm 13,2

Média \pm EPM do tempo de imobilidade obtido no TNF e atividade locomotora no TCA, observados após microinjeção intra-NMR (0,25 μl /30s) de 8-OHDPAT (5,0 μg) ou salina, seguido de xantona (0,3 ng) ou veículo, em ratos (n = 10-16).

5. DISCUSSÃO

O presente estudo avaliou o envolvimento dos neurônios serotoninérgicos do NMR de ratos, através da microinjeção de ligantes 5-HT_{1A} e da xantona, no comportamento de imobilidade produzido no teste de estímulo aversivo incondicionado do nado forçado, e na atividade locomotora no TCA.

A microinjeção intra-NMR do agonista 5-HT_{1A}, 8-OHDPAT, em ratos, produziu um aumento no tempo de imobilidade no TNF. A administração prévia intra-NMR do antagonista, Way₁₀₀₆₃₅, bloqueou o efeito produzido pelo 8-OHDPAT, demonstrando que o efeito do agonista foi mediado por receptores 5-HT_{1A} somatodendríticos localizados no NMR.

Nossos resultados estão de acordo com a literatura, onde a administração de 8-OHDPAT diretamente em auto-receptores 5-HT_{1A}, no NDR ou NMR, inibe a atividade de neurônios serotoninérgicos, levando a uma redução na liberação de 5-HT em áreas de projeção (KREISS; LUCKI, 1994; PORTAS et al., 1996; MONTI; JANTOS; MONTI, 2002). No mesmo sentido, a microinjeção de 8-OHDPAT diretamente no NMR promove um efeito ansiolítico em ratos submetidos ao teste do labirinto em cruz-elevado, mediado por receptores 5-HT_{1A} pré-sinápticos (FILE; GONZALEZ; ANDREWS, 1996; DE ALMEIDA et al., 1998).

A administração sistêmica do 8-OHDPAT produz efeito anti-imobilidade no TNF, ou efeito ansiolítico no teste de vocalização ultrassônica, e tratamento prévio com Way₁₀₀₆₃₅, bloqueia o efeito do agonista nos dois modelos experimentais (MOSER; SANGER, 1999; DE VRY et al., 2004), demonstrando que os efeitos do 8-OHDPAT são mediados por receptores 5-HT_{1A} pós e pré-sinápticos, respectivamente (DE VRY, 1995).

O 8-OHDPAT microinjetado intra-NDR também aumentou o tempo de imobilidade de ratos no TNF (MARTINS, 2005). Porém, a dose efetiva do agonista 5-HT_{1A} administrada no NMR (5,0 µg), foi 16,6 vezes maior do que no NDR (0,3 µg) no TNF. Nossos resultados estão de acordo com a afirmação de que a inibição mediada por agonistas seletivos em receptores 5HT_{1A} é claramente mais potente em neurônios serotoninérgicos do NDR do que no NMR (LECHIN; VAN DER DIJS; HERNANDEZ-ADRIÁN, 2006).

A inibição nos disparos neuronais promovida pela administração sistêmica de agonistas de receptores 5-HT_{1A} parece ser mais significativa em regiões inervadas pelo NDR (córtex frontal e estriado), do que pelo NMR (hipocampo dorsal e ventral) (CASANOVAS; LÉSOUD; ARTIGAS, 1997). A administração sistêmica do ISRS, fluoxetina, também aumenta a produção de 5-HT nos núcleos da rafe e reduz sua liberação de forma mais pronunciada no córtex frontal e estriado, em comparação ao hipocampo dorsal (HERVÁS; ARTIGAS, 1998). Esta maior sensibilidade de auto-receptores no NDR pode ser devido a maior quantidade (5 vezes) de neurônios serotoninérgicos (WEISSMANN-NANOPOULOS et al., 1985 apud LECHIN; VAN DER DIJS; HERNANDEZ-ADRIÁN, 2006).

Beck e colaboradores (2004) mostraram que neurônios não serotoninérgicos apresentam características similares aos serotoninérgicos no NDR enquanto que no NMR, esta semelhança não ocorre, e ainda, que a resposta mediada por receptores 5-HT_{1A} está presente nos dois tipos de neurônios do NDR e somente em neurônios serotoninérgicos do NMR. Assim, a resposta mediada por ligantes 5-HT_{1A} microinjetados intra-NMR demonstra maior especificidade serotoninérgica do que a mediada pela microinjeção intra-NDR.

O aumento no tempo de imobilidade promovido pela microinjeção de 8-OHDPAT intra-NMR ou NDR, indica que neurônios serotoninérgicos destas regiões

estão seletivamente envolvidos na modulação do comportamento de “desespero comportamental”, caracterizado pela postura de imobilidade dos animais no TNF.

O NMR envia projeções para diferentes áreas do sistema límbico, incluindo o hipocampo dorsal, que está particularmente implicado na mediação de comportamentos defensivos desencadeados em situações de estresse crônico (DEAKIN; GRAEFF, 1991), como o comportamento de imobilidade no TNF.

Considerando que a depressão está relacionada à redução da 5-HT em áreas cerebrais inervadas por vias neuronais serotoninérgicas oriundas do NMR (DEAKIN; GRAEFF, 1991), o aumento no tempo de imobilidade no TNF observado após a microinjeção de 8-OHDPAT diretamente no NMR, sugere redução da disponibilidade e atividade de 5-HT sobre estruturas relacionadas à depressão, como o hipocampo dorsal.

O antagonista Way₁₀₀₆₃₅, microinjetado intra-NMR, produziu uma diminuição no tempo de imobilidade em ratos submetidos ao TNF, provavelmente devido ao bloqueio dos auto-receptores inibitórios somatodendríticos 5-HT_{1A} e conseqüente aumento na concentração de 5-HT em regiões pós-sinápticas. Embora o Way₁₀₀₆₃₅ seja considerado um antagonista puro, desprovido de atividade intrínseca (FLETCHER et al., 1996), em nosso estudo, o TNF foi sensível para detectar o efeito da sua administração intra-NMR. Este resultado está de acordo com um grande número de evidências que têm demonstrado que o Way₁₀₀₆₃₅ pode aumentar os disparos de neurônios serotoninérgicos (FORNAL et al., 1996; BJORVATN et al., 2000; HAJÒS et al., 2001) e a liberação de 5-HT nos terminais prosencefálicos (DUDLEY; DINARDO; GLASS, 1999).

Santos e colaboradores (2005) mostraram que a injeção intra-NMR de Way₁₀₀₆₃₅, facilita a esQUIVA inibitória, indicativo de efeito ansiogênico, no teste do labirinto em T elevado. Além disso, o antagonista Way₁₀₀₆₃₅, quando administrado por

via subcutânea, apresentou uma tendência em aumentar o tempo de imobilidade de ratos submetidos ao TNF (MOSER; SANGER, 1999) provavelmente por bloquear receptores 5-HT_{1A} pós-sinápticos.

Antagonistas de auto-receptores 5-HT_{1A} têm sido comumente utilizados na tentativa de acelerar o início do efeito clínico na terapia antidepressiva, já que drogas como ISRS agem inicialmente, estimulando estes auto-receptores inibitórios 5HT_{1A} e reduzindo a liberação de 5-HT nos terminais de projeção (ARTIGAS et al., 2001).

Cousins e Seiden (2000) relataram que, enquanto doses mais baixas do antagonista Way₁₀₀₆₃₅ agem facilitando o aparecimento do efeito da dose sub-efetiva de fluoxetina, a administração sistêmica de altas doses do antagonista, atenua seu efeito antidepressivo, sugerindo que o aumento excessivo nos níveis de 5-HT provocado pelo bloqueio dos auto-receptores 5-HT_{1A}, combinado à inibição da recaptção de 5-HT produzida pela fluoxetina, se sobrepõe à ação do antagonista, reduzindo os disparos neuronais. Dessa forma, o aumento excessivo nos níveis de 5-HT, bloqueia os disparos neuronais serotoninérgicos, reduzindo a liberação de 5-HT. Isto está de acordo com outros autores que afirmam que a ativação excessiva dos auto-receptores 5-HT_{1A} resulta na redução da liberação de 5-HT nas projeções neuronais (RUETER; FORNAL; JACOBS, 1997, apud BLIER; WARD, 2003).

Nossos resultados mostraram um padrão similar, onde a microinjeção intra-NMR de Way₁₀₀₆₃₅, produziu efeito anti-imobilidade com a dose intermediária (2,5 µg), mas não com a dose mais alta (5,0 µg), não apresentando uma relação dose-resposta linear, sugerindo que na maior dose, o aumento excessivo nos níveis de 5-HT no NMR, interferiu na detecção do efeito no TNF.

Assim como observado com o Way₁₀₀₆₃₅, a microinjeção da xantona reduziu o tempo de imobilidade de ratos submetidos ao TNF, e sua dose inefetiva, interagiu com o Way₁₀₀₆₃₅, onde o antagonista permitiu o aparecimento do efeito anti-imobilidade. A

interação observada reforça a idéia de que o bloqueio dos auto-receptores inibitórios desencadeou um aumento na neurotransmissão serotoninérgica e na liberação de 5-HT nas áreas de projeção, refletindo em um efeito biológico e sugere que a xantona está agindo como antagonista 5-HT_{1A}.

A associação da microinjeção prévia do agonista 5-HT_{1A}, 8-OHDPAT 5,0 µg, com a xantona 0,3 ng, intra-NMR, anulou os efeitos produzidos por cada um dos compostos no TNF, porém não houve interação estatística entre eles, o que sugere que a hiperpolarização dos neurônios serotoninérgicos produzida pela microinjeção prévia do agonista, não foi revertida pela xantona, a um nível detectável no TNF.

No TCA, ANOVA de um fator não mostrou alteração na atividade locomotora para nenhum dos tratamentos. Nossos resultados estão de acordo com outros que mostram que a microinjeção de 8-OHDPAT ou Way₁₀₀₆₃₅ no NMR não produziram efeito sobre a atividade locomotora de ratos submetidos ao mesmo teste (SANTOS; ANDRADE; ZANGROSSI, 2005). Entretanto, muitos trabalhos mostram que microinjeção de 8-OHDPAT no NMR de ratos produziram hiperatividade (HIGGINS; ELLIOTT, 1991; AVANZI; BRANDÃO, 2001; FUNK et al., 2005). Shim e colaboradores (1997) mostraram que a microinjeção do agonista 8-OHDPAT no NMR, promoveu uma alta inibição na liberação de 5-HT hipocampal, porém não promoveu aumento significativo na atividade locomotora, afirmando que células serotoninérgicas deste núcleo devem exercer pouca influência sobre a locomoção. Enquanto o NDR inerva estruturas principalmente relacionadas com atividade motora como, por exemplo, os gânglios da base, o NMR inerva preferencialmente regiões límbicas como septo medial e hipocampo (McQUADE; SHARP, 1997).

No entanto, nos estudos de associação, detectamos interação, onde a microinjeção de Way₁₀₀₆₃₅ 5,0 µg + 8-OHDPAT 5,0 µg aumentou a locomoção comparada aos compostos isolados, retornando aos valores de controle. Ainda, no

estudo da associação do Way₁₀₀₆₃₅ + xantona houve uma diminuição da atividade locomotora para a microinjeção do Way₁₀₀₆₃₅ nas duas doses. A detecção de efeito provavelmente se deve a uma maior sensibilidade do teste estatístico utilizado nos estudos de associação.

Segundo Lechin e colaboradores (2006), axônios serotoninérgicos do NDR estimulam neurônios dopaminérgicos que por sua vez promovem liberação de DA a nível estriatal, produzindo hipermotilidade. Axônios serotoninérgicos do NMR estimulam neurônios dopaminérgicos da área tegmental ventral que chegam ao córtex frontal, que por sua vez promovem inibição na liberação de DA no estriado através de axônios glutamatérgicos córtico-estriatal. Nossos resultados sugerem que o bloqueio de receptores inibitórios 5-HT_{1A} pelo Way₁₀₀₆₃₅, promoveu um aumento de 5-HT no NMR e provavelmente modulou os níveis de DA no córtex frontal resultando na hipolocomoção dos animais, apesar do efeito do Way₁₀₀₆₃₅ não ter sido estatisticamente significativo no estudo de associação com o 8-OHDPAT.

Diante destes resultados podemos observar que os neurônios do NMR estão envolvidos na modulação da imobilidade produzida no TNF e da atividade locomotora no TCA, que foram sensíveis para detectar efeito de ligantes de receptores 5-HT_{1A} microinjetados intra-NMR. Assim, a ativação pelo 8-OHDPAT promoveu aumento no tempo de imobilidade que pode estar relacionado à redução na liberação de 5-HT em áreas de projeção prosencefálicas, como o hipocampo, e além disso, a dose necessária para aparecimento do efeito foi muito maior que a necessária no NDR. A participação dos receptores 5-HT_{1A} foi confirmada pelo bloqueio do efeito do 8-OHDPAT pelo Way₁₀₀₆₃₅.

O TNF também foi sensível para detectar redução no tempo de imobilidade com a microinjeção intra-NMR do antagonista puro 5-HT_{1A}, Way₁₀₀₆₃₅, que pode estar relacionado ao aumento na liberação de 5-HT, promovido pelo bloqueio de receptores

inibitórios 5-HT_{1A} do NMR. A xantona promoveu uma diminuição no tempo de imobilidade de ratos no TNF, semelhante ao antagonista Way₁₀₀₆₃₅, e houve interação entre eles, mostrando que neurônios serotoninérgicos do NMR estão envolvidos no efeito da xantona. A xantona poderá vir a ser protótipo de droga com perfil de atividade antidepressiva. No TCA, não houve alteração na atividade locomotora dos animais na realização da curva dose-efeito, porém, no estudo de associação de drogas houve diminuição no número de cruzamentos para o Way₁₀₀₆₃₅ e interação entre os ligantes 5-HT_{1A}, sugerindo o envolvimento dos neurônios serotoninérgicos do NMR na atividade locomotora.

6. CONCLUSÕES

Foi observado o envolvimento dos neurônios serotoninérgicos do NMR na modulação da imobilidade no TNF e da atividade locomotora no TCA, através da microinjeção de ligantes 5-HT_{1A}.

O 8-OHDPAT aumentou o tempo de imobilidade em ratos submetidos ao TNF devido a estimulação de auto-receptores 5-HT_{1A} do NMR. A participação dos receptores 5-HT_{1A} foi confirmada pelo bloqueio deste efeito com a microinjeção prévia do antagonista seletivo Way₁₀₀₆₃₅.

O Way₁₀₀₆₃₅ diminuiu o tempo de imobilidade em ratos submetidos ao TNF e diminuiu a atividade locomotora no TCA, devido ao bloqueio de auto-receptores inibitórios 5-HT_{1A} do NMR.

A xantona produziu uma diminuição no tempo de imobilidade de ratos no TNF, semelhante à produzida pelo antagonista Way₁₀₀₆₃₅, e houve interação entre eles, mostrando que a substância pura interage com o sistema serotoninérgico ou sofre interferência do mesmo, podendo vir a ser protótipo de droga com perfil de atividade antidepressiva.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADELL, A.; CELADA, P.; ARTIGAS, F. The role of 5-HT_{1B} receptors in the regulation of serotonin cell firing and release in the rat brain. **Journal of Neurochemistry**, v.79, p.172-182, 2001.

ARTIGAS, F., et al. Acceleration of the effect of selected antidepressant drugs in major depression by 5-HT_{1A} antagonists. **Trends in Neurosciences**, v.19, p.378-383, 1996.

ARTIGAS, F., et al. How does pindolol improve antidepressant action? **Trends in Pharmacological Sciences**, v.22, n.5, p. 224-228, 2001.

AUDI, E.A., et al. Preliminary Evaluation of *Kielmeyera coriacea* leaves extract on central nervous system. **Fitoterapia**, v.73, p.517-519, 2002.

AVANZI, V.; BRANDÃO, M.L. Activation of somatodendritic 5-HT_{1A} autoreceptors in the median raphe nucleus disrupts the contextual conditioning in rats. **Behavioural Brain Research**, v.126, p.175-184, 2001.

BARNES, N.M.; SHARP, T. A review of central 5-HT receptors and their function. **Neuropharmacology**, v.38, p.1083-1152, 1999.

BECK, G., et al. Median and Dorsal Raphe Neurons are not electrophysiologically identical. **Journal of Neurophysiology**, v.91, p. 994-1005, 2004.

BLIER, P.; BERGERON, R. Effectiveness of pindolol with selected antidepressant drugs in the treatment of major depression. **Journal of Clinical Psychopharmacology**, v.15, n.3, p.217-222, 1995.

BJORVATN, B., et al. Venlafaxine and its interaction with Way₁₀₀₆₃₅: effects on serotonergic unit activity and behaviour in cats. **European Journal of Pharmacology**, v.404, p.121-132, 2000.

BRENNER, B., et al. Comparison of an extract of hypericum (LI 160) and sertraline in the treatment of depression: a double-blind, randomized pilot study. **Clinical Therapeutics**, v.22, n.4, p.411-419, 2000.

CARLINI, E.A. Plants and the central nervous system. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v.75, p.501-512, 2003.

CASANOVAS, J.M.; LÉSOUD, M.; ARTIGAS, F. The effect of the selective 5-HT_{1A} agonist alnespirone (S-20499) and 8-OHDPAT on extracellular 5-hydroxytryptamine in different regions of rat brain. **British Journal of Pharmacology**, v. 122, p. 733-741, 1997.

CORRADETTI, R., et al. Electrophysiological effects of N-(2-(4-(2-Methoxyphenyl)-1-Piperazinyl)ethyl)-N-(2-Pyridinyl) Cyclohexane Carboxamide (Way₁₀₀₆₃₅) on dorsal

raphe serotonergic neurons and CA1 hippocampal pyramidal cells in vitro. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 278, p.679-688, 1996.

CORTEZ, D.A.G., et al. Xanthones, Triterpenes and a Biphenyl from *Kielmeyera coriacea*, **Phytochemistry**, Kidlington, v.47, n.7, p.1367-1374, 1998.

COUSINS, M.S.; SEIDEN, L.S. The serotonin-1A receptor antagonist Way-100635 modifies fluoxetine's antidepressant-like profile on the differential reinforcement of low rates 72-s schedule in rats. **Psychopharmacology**, v. 148, p.438-442, 2000.

DEAKIN, J.W.F.; GRAEFF, F.G. 5-HT and mechanisms of defence. **Journal of Psychopharmacology**, v. 5, p. 305-315, 1991.

DE ALMEIDA, R.M.M., et l. 8-OHDPAT in the median raphe nucleus decreases while in the medial septal area it may increase anxiety in female rats. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 23, p.259-264, 1998.

DELGADO, P.L., et al. Tryptophan-depletion challenge in depressed patients treated with desipramine or fluoxetine: implications for the role of serotonin in the mechanism of antidepressant action. **Biology Psychiatry**, v. 46, p. 212-220, 1999.

DETKE, M.J.; LUCKI, I. Detection of serotonergic and noradrenergic antidepressants in the rat forced swimming test: the effects of water depth. **Behavioural Brain Research**, v. 73, p.43-46, 1996.

DE VRY, J. 5-HT_{1A} receptor ligands: recent developments and controversial issues. **Psychopharmacology**, v.121, p. 1-26, 1995.

DE VRY, J., et l. Comparison of hypericum extracts with imipramine and fluoxetine in animal models of depression and alcoholism. **European Neuropsychopharmacology**, v. 9, p.461-468, 1999.

DE VRY, J., et l. 5-HT_{1A} receptors are differentially involved in the anxiolytic – and antidepressant – like effects of 8-OHDPAT and fluoxetine in the rat. **European Neuropsychopharmacology**, v. 14, p.487-495, 2004.

DONG, J.; DE MONTIGNY, C.; BLIER, P. Effect of acute and repeated versus sustained administration of the 5-HT_{1A} receptor agonist ipsapirone: electrophysiological studies in the rat hippocampus and dorsal raphe. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 356, p.303-311, 1997.

DONG, J.; DE MONTIGNY, C.; BLIER, P. Full agonistic properties of BayX3702 on presynaptic and postsynaptic 5-HT_{1A} receptors electrophysiological studies in the rat hippocampus and dorsal raphe. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 286, p.1239-1247, 1998.

DUDLEY, T.E.; DINARDO, L.A.; GLASS, D.J. In vivo assessment of the midbrain raphe nuclear regulation of serotonin release in the hamster suprachiasmatic nucleus. **Journal of Neurophysiology**, v.81, p.1469-1477, 1999.

FILE, S.E.; GONZALEZ, L.E.; ANDREWS, N. Comparative study of pre- and postsynaptic 5-HT_{1A} receptor modulation of anxiety in two ethological animal tests. **The Journal of Neuroscience**, v.16, n.15, p.4810-4815, 1996.

FLETCHER, A., et al. Electrophysiological, biochemical, neurohormonal and behavioural studies with Way₁₀₀₆₃₅, a potent, selective and silent 5-HT_{1A} receptor antagonist. **Behavioural Brain Research**, v. 73, p.337-353, 1996.

FORNAL, C.A., et al. Way₁₀₀₆₃₅, a potent and selective 5-hydroxytryptamine_{1A} antagonist, increases serotonergic neuronal activity in behaving cats: comparison with (S)- Way-100635. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 278, p.752-762, 1996.

FORNAL, C.A., et al. Pindolol increases extracellular 5-HT while inhibiting serotonergic neuronal activity. **European Journal of Pharmacology**, v.377, p.187-191, 1999.

FUNK, D., et al. Effects of injections of 8-hydroxy-2-(di-*n*-propylamino) tetralin or muscimol in the median raphe nucleus on *c-FOS* mRNA in the rat brain. **Neuroscience**, v. 131, p.475-479, 2005.

GOULART, Y.C.F., et al. Involvement of serotonin in the antidepressant-like effect of extract from *Kielmeyera coriacea* stems. **Pharmaceutical Biology**, v.45, n.3, p.1-7, 2007.

GRAEFF, F.G., et al. Role of 5-HT in stress, anxiety, and depression. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v.54, n.1, p.129-141, 1995.

HAIJÓS, M., et al. Different tonic regulation of neuronal activity in the rat dorsal raphe and medial prefrontal cortex via 5-HT_{1A} receptors. **Neuroscience Letters**, v. 304, p.129-132, 2001.

HERVÁS, I.; ARTIGAS, F. Effect of fluoxetine on extracellular 5-hydroxytryptamine in rat brain. Role of 5-HT autoreceptors. **European Journal of Pharmacology**, v.358, p.9-18, 1998.

HERVÁS, I., et al. In vivo control of 5-hydroxytryptamine release by terminal autoreceptors in the rat brain areas differentially innervated by the dorsal and median raphe nuclei. **Naunyn-Schmiedebert's Arch Pharmacology**, v.258, n.3, p.315-322, 1998.

HIGGINS, G.A.; ELLIOTT, P.J. Differential behavioural activation following intraraphe infusion of 5-HT_{1A} receptor agonists. **European Journal of Pharmacology**, n.193, p. 351-356, 1991.

HJORTH, S.; BENGTSSON, H.J.; MILANO, S. Raphe 5-HT_{1A} receptors, but not postsynaptic 5-HT_{1A} receptors or β -adrenoceptors, restrain the citalopram-induced increase in extracellular 5-hydroxytryptamine in vivo. **European Journal of Pharmacology**, v.316, p.43-47, 1996.

HOYER, D., et al. International union of pharmacology classification of receptors for 5-hydroxytryptamine (serotonin). **Pharmacological Reviews**, v.46, p.157-204, 1994.

HOYER, D.; HANNON, J.P.; MARTIN, G.R. Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors. **Pharmacology, Biochemistry and Behaviour**, v.71, p.533-554, 2002.

JASTRZEBSKA-WIESED, M., et al. Central activity of new xanthone derivatives with chiral center in some pharmacologica tests in mice. **Polish Journal of Pharmacology**, v.55, p 461-465, 2003.

KREISS, D.S.; LUCKI, I. Differential regulation of serotonin (5-HT) release in the striatum and hippocampus by 5-HT_{1A} autoreceptors of the dorsal and median raphe nucleus. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.269, n.3, p.1268-1279, 1994.

KIRBY, L.G.; ALLEN, A.R.; LUCKI, I. Regional differences in the effects of forced swimming on extracellular levels of 5-hydroxytryptamine and 5-hydroxyindoleacetic acid. **Brain Research**, v.682, p.189-196, 1995.

LECHIN, F.; VAN DER DIJS, B.; HERNÁNDEZ-ADRIÁN, G. Dorsal raphe vs. Median raphe serotonergic antagonism. Anatomical, physiological, behavioral, neuroendocrinological, neuropharmacological and clinical evidences: Relevance for neuropharmacological therapy. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v.30, n.4, p.565-585, 2006.

LUCKI, I. The forced swimming test as a model for core and component behavioral effects of antidepressant drugs. **Behavioural Pharmacology**, v. 8, p. 523-532, 1997.

LUCKI, I. The spectrum of behaviours influenced by serotonin. **Society of Biological Psychiatry**, v.44, p.151-162, 1998.

MAES, M.; MELTZER, H.Y. The serotonin hypothesis of major depression. **Psychopharmacology**, p. 933-944, 1995.

MARTINS, J.V.C., et al. Pharmacological activity of lyophilized hydroethanolic extract from *Kielmeyera coriacea* stems in rats. **Acta Scientiarum Health Sciences**, v.26, n. 2, p. 148-153, 2004.

MARTINS, J.V.C. **Pharmacological profile of xanthonic constituent of Kielmeyera coriacea extract in rats**. 2005. Dissertação (Mestrado)-Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2005.

MARTINS, J.V.C., et al. Behavioral effects of *Kielmeyera coriacea* extract in rats. **Indian Journal of Pharmacology**, v.38, n.6, p.427-428, 2006.

McQUADE, R.; SHARP, T. Functional mapping of dorsal and median raphe 5-hydroxytryptamine pathways in forebrain of the rat using microdialysis. **Journal of Neurochemistry**, v.69, p.791-796, 1997.

MONTI, J.M.; JANTOS, H.; MONTI, D. Increased REM sleep after intra-dorsal raphe nucleus injection of flesinoxam or 8-OHDPAT: prevention with Way100635. **European Neuropsychopharmacology**, v.12, p.47-55, 2002.

MOSER, P.C.; SANGER, D.J. 5-HT_{1A} receptors neither potentiate nor inhibit the effects of fluoxetine and biefloxatone in the forced swim test in rats. **European Journal of Pharmacology**, v.372, p.127-134, 1999.

OHISHI, N., et al. Xanthone derivatives as inhibitors for monoamine oxidase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.10, p.291-294, 2000.

OTOBONE, F. J., et al. Role of 5-HT_{1A} receptors in antidepressant-like effect of dichloromethane fraction of *Kielmeyera coriacea* in rats subjected to the forced swim test. **Indian Journal of Pharmacology**, v.39, n.2, p.75-79, 2007.

PAXINOS, G.; WATSON, C. **The rat brain in stereotaxic coordinates**, 5.ed. San Diego: Academic press inc, 2005.

PINTO, A.C., et al. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Química Nova**, v.25, n.1, p.45-61, 2002.

PORSOLT, R.D.; BERIN, A.; JALFRE, M. Behavioural despair in mice: a primary screening test for antidepressant. **Arch Int Pharmacodyn Ther**, v.229, p.327-336, 1977.

PORSOLT, R.D., et al. Behavioural despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatments. **European Journal of Pharmacology**, v. 47, p. 379-391, 1978.

PORSOLT, R.D., et al. Immobility induced by forced swimming in rats: effects of agents which modify central catecholamine and serotonin activity. **European Journal of Pharmacology**, v. 57, p. 201-210, 1979.

PORTAS, C.M., et al. THAKKAR, M.; RAINNIE, D.; McCARLY, R.W. Microdialysis perfusion of 8-hydroxy-2-(di-*n*-propylamino) tetralin (8-OH-DPAT) in the dorsal raphe nucleus decreases serotonin release and increases rapid eye movement sleep in the freely moving cat. **The Journal of Neuroscience**, v.16, n.8, p.2820-2828, 1996.

REDROBE, J.P.; MacSWEENEY, C.P.; BOURIN, M. The role of 5-HT_{1A} and 5-HT_{1B} receptors in antidepressant drug actions in the mouse forced swimming test. **European Journal of Pharmacology**, v.318, p.213-220, 1996.

ROYCE, J.R. On the construct validity of open-field measures. **Psychological Bulletin**, v.84, n.6, p.1098-1106, 1977.

ROMERO, L.; HERVÁS, I.; ARTIGAS, F. The 5-HT_{1A} antagonist Way-100635 selectively potentiates the presynaptic effects of serotonergic antidepressants in the rat brain. **Neuroscience Letters**, v.219, p.123-126, 1996.

RUETER, L.E.; FORNAL, C.A.; JACOBS, B.L. A critical review of 5-HT brain microdialysis and behavior. **Reviews in the Neurosciences**, v.8, p.117-137, 1997 apud BLIER, P.; WARD, N. Is there a role for 5-HT_{1A} agonists in the treatment of depression. **Biological Psychiatry**, v.50, p.13-21, 2001.

SANTOS, L.; ANDRADE, T.G.C.S.; ZANGROSSI, H. J. Serotonergic neurons in the median raphe nucleus regulate inhibitory avoidance but not escape behaviour in the rat elevated T-maze test of anxiety. **Psychopharmacology**, v.179, p.733-741, 2005.

STAHL, S.M. Mechanisms of action of serotonin selective reuptake inhibitors. Serotonin receptors and pathways mediate therapeutic effects and side effects. **Journal of Affective Disorders**, v.51, p.215-235, 1998.

SHIM, I.; JAVAID, J.; WIRTSHAFTER, D. Dissociation of hippocampal serotonin release and locomotor activity following pharmacological manipulations of the median raphe nucleus. **Behavioural Brain Research**, v.89, p. 191-198, 1997.

TOMIC, M., et al. Neuropharmacological evaluation of diethylether extract and xanthones of *Gentiana kochiana*. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v.81, p.535-542, 2005.

VEIGA JUNIOR, V.F.; PINTO, A.C., MACIEL, M.A.M. Plantas medicinais: cura segura? **Química Nova**, v.28, n.3, p.519-528, 2005.

WEISSMANN-NANOPOULOS, D., et al. Evidence for localization of 5-HT_{1A} binding sites on serotonin containing neurons in the raphe dorsalis and raphe centralis nuclei of the rat brain. **Neurochemistry International**, v.7, p.1061-1072, 1985 apud LECHIN, F.; VAN DER DIJS, B.; HERNÁNDEZ-ADRIÁN, G. Dorsal raphe vs. Median raphe serotonergic antagonism. Anatomical, physiological, behavioral, neuroendocrinological, neuropharmacological and clinical evidences: Relevance for neuropharmacological therapy. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v.30, n.4, p.565-585, 2006.

WONG, M-L.; LICINIO, J. Research and treatment approaches to depression. **Nature Reviews Neuroscience**, v.2, p.343-351, 2001.

YUNES, R.A.; PEDROSA, R.C.; CECHINEL FILHO, V. Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. **Química Nova**, v.24, n.1, p.147-152, 2001.