

UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

Avaliação da toxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade e dos efeitos antidepressivo e ansiolítico do extrato etanólico dos frutos da *Campomanesia pubescens* (D.C.) O. BERG em ratos

GUSTAVO ROBERTO VILLAS BOAS

Dourados - MS

2018

GUSTAVO ROBERTO VILLAS BOAS

Avaliação da toxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade e dos efeitos antidepressivo e ansiolítico do extrato etanólico dos frutos da *Campomanesia pubescens* (D.C.) O. BERG em ratos

Área do CNPq: Ciências da Saúde: 04.00.00.00-1.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), para obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde.

Área de concentração: Farmacologia.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Silvia Aparecida Oesterreich.
Co-orientadora: Prof.^a Dr.^a Roseli Boerngen de Lacerda.

Dourados - MS

2018



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

ATA DA DEFESA DE **TESE DE DOUTORADO** APRESENTADA PELO CANDIDATO GUSTAVO ROBERTO VILLAS BOAS, ALUNO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM CIÊNCIAS DA SAÚDE ÁREA DE CONCENTRAÇÃO "**FARMACOLOGIA**".

Aos seis dias do mês de junho do ano de dois mil e dezoito (06/06/2018), às 09h, em sessão pública, realizou-se, na sala 05, Bloco C da Universidade Federal Grande Dourados, a Defesa de Tese de Doutorado intitulada "Avaliação da toxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade e dos efeitos antidepressivo e ansiolítico do extrato etanólico dos frutos da *Campomanesia pubescens* (D.C.) O. BERG em ratos" apresentada pelo discente **GUSTAVO ROBERTO VILLAS BOAS**, do Programa de Pós-Graduação Doutorado em Ciências da Saúde, à Banca Examinadora constituída pelos professores **Dra. Silvia Aparecida Oesterreich** (Presidente/orientadora), **Dra. Raquel dos Santos Donatini** (membro suplente/UFGD), **Dr. Kelly Mari Pires de Oliveira** (membro titular/programa), **Dr. Pablo Christiano Barboza Lollo** (membro titular/UFGD), e **Dr. Renato Silva Nacer** (membro titular/externo). Iniciada a sessão, a presidência deu a conhecer ao candidato e aos integrantes da Banca as normas a serem observadas na apresentação da Tese. Após o candidato ter apresentado a sua Tese, no tempo previsto de 40 até 50 minutos, os componentes da Banca Examinadora fizeram suas arguições, que foram intercaladas pela defesa do candidato, no tempo previsto de até 240 minutos. Terminadas as arguições, a Banca Examinadora, em sessão secreta, passou ao julgamento, tendo sido o candidato considerado **APROVADO**, fazendo *jus* ao título de **DOUTOR EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**. Nada mais havendo a tratar, lavrou-se a presente ata, que vai assinada pelos membros da Banca Examinadora.

Dourados, 06 de junho de 2018.

Dra. Silvia Aparecida Oesterreich

Dra. Raquel dos Santos Donatini

Dra. Kelly Mari Pires de Oliveira

Dr. Pablo Christiano Barboza

Dr. Renato Silva Nacer

ATA HOMOLOGADA EM: ___/___/___, PELA PRÓ-REITORIA DE ENSINO DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA / UFGD.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à Deus,
minha esposa e família. Sem vocês
nada seria possível.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por sua soberania sobre minha vida e sonhos e por ter guiado as minhas decisões, fazendo com que a Sua vontade sempre esteja no centro da minha família. Agradeço a Ele por ter proporcionado o inigualável sentimento de conquista ao concluir o curso de doutoramento, pois muitos gostariam de ter esse privilégio. Bendito és Tu Senhor, que com Teu sublime amor me acolheu em Seus átrios nos momentos de solidão, cansaço e tristezas e me livrou dos inimigos. Obrigado por me ensinar a perdoar e a amar, porque sublime é o perdão e puro é o amor. Ao Senhor sou grato *“Sempre e por toda parte, isto reconhecemos com toda a **gratidão**”* At 24.3; *“Habite, ricamente, em vós a palavra de Cristo; instruí-vos e aconselhai-vos mutuamente em toda a sabedoria, louvando a Deus, com salmos, e hinos, e cânticos espirituais, com **gratidão**, em vosso coração”* Cl 3.16.

Agradeço a todas as pessoas do meu convívio que acreditaram e contribuíram, mesmo que indiretamente, para a conclusão deste curso.

Meu agradecimento mais profundo e especial apenas pode ser dedicado a uma pessoa: minha esposa. Sempre esteve ao meu lado, incondicionalmente. Em momentos muito difíceis, que diga-se de passagem, não foram escassos nestes últimos anos, me ajudou a crer e nunca esquecer do nosso Senhor, trazendo a memória que este dia chegaria: A Defesa! Chegar ao fim foi difícil, porém, gratificante. Este período nos demonstrou a verdade sobre nossa vida juntos: realmente somos UMA FAMÍLIA e tanto. Sou grato por cada sorriso, gesto de carinho, por toda felicidade, compreensão, apoio, incentivo e dedicação, sempre me amando e respeitando. Você, sem sombra de dúvidas, é o maior e melhor presente que Deus poderia ter me dado nesta vida. Sempre fará parte de cada vitória.

Aos meus avós-pais Ubaldo Walmor Barbosa e Maria Lúcia de Moraes Barbosa, pelo amor incondicional e apoio, mesmo que distante. Por terem feito o possível e o impossível para me oferecerem a oportunidade de estudar, acreditando e respeitando minhas decisões e nunca deixando que as dificuldades acabassem com os meus sonhos, serei imensamente grato.

À minha orientadora, Professora Dr^a Silvia, que, como minha orientadora de TCC na graduação, iniciou em minha vida o ciclo da docência e pesquisa, sendo um exemplo profissional que me estimulou a chegar onde estou hoje. Não sabemos explicar como estas coisas acontecem, mas eu sentia que não apenas iniciaria o ciclo, mas contribuiria diretamente para o seu encerramento; obrigado pela sua orientação no meu doutoramento. Agradeço pelos conselhos e palavras de experiência acurada e estímulo, bem como pela confiança que depositou

em mim, permitindo que, com liberdade, chegasse a bom porto e concluísse minha tese de doutorado. Muito obrigado pelo empenho, paciência e credibilidade, este trabalho tem muito de você. Desejo que continuemos a caminhar juntos neste novo ciclo que se inicia.

Agradeço a minha co-orientadora, professora Roseli, por estar sempre disposta a contribuir e por ter aceito fazer parte deste trabalho.

A todos os familiares, minha mãe Cláudia, minhas irmãs Andressa, Laís e Gabi, meu irmão-tio Bruno e sua esposa Priscila, minhas sobrinhas, Yasmin, Lavínia, Sophia, Geovana e Elisa, meus Tios “Turco”, Mary e Nice, a minha prima Anna Paula, meus sogros Claudio e Gilce e aos meus cunhados Emely, André e Maiara que torceram e acreditaram na conclusão dessa pós-graduação. Obrigado grande família “Buscapé”!!!

Aos amigos, “é uma festa” pelas agradáveis lembranças que serão eternamente guardadas no coração, muito obrigado.

Ao grupo de pesquisa “Biologia Aplicada a Saúde” pela troca de experiências.

A todos os meus alunos de TCC da Unigran que contribuíram com seu imenso e valioso trabalho. Levarei vocês no coração por onde eu caminhar com admiração e muito carinho.

A todos vocês, meu muito obrigado!!!

EPÍGRAFE

“Será que um homem que ama o seu Senhor estaria disposto a ver Jesus vestindo uma coroa de espinhos, enquanto ele mesmo almeja uma coroa de louros? Haveria Jesus de ascender ao trono por meio da cruz, enquanto nós esperamos ser conduzidos para lá nos ombros das multidões, em meio a aplausos? Não seja tão fútil em sua imaginação. Avalie o preço; e, se você não estiver disposto a carregar a cruz de Cristo, volte à sua fazenda ou ao seu negócio e tire deles o máximo que puder, mas permita-me sussurrar em seus ouvidos: “Que aproveita ao homem ganhar o mundo inteiro e perder a sua alma?”

(Charles Spurgeon)

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

REVISÃO DE LITERATURA

Figura 1. Frutos da <i>C. pubescens</i> utilizada como flavorizante na cachaça.	25
Figura 2. Frutos de gabioba (<i>Campomanesia adamantium</i>) classificados pelo tamanho em: grande (G), médio grande (MG), médio pequeno (MP) e pequeno (P).....	27
Figura 3. Imagem ilustrativa da <i>C. pubescens</i>	29
Figura 4. Estrutura básica de um flavonoide	32
Figura 5. Labirinto em Cruz Elevado	41
Figura 6. Imagem ilustrativa da arena utilizada no teste do campo aberto.	42
Figura 7. Imagem ilustrativa do aparato utilizado no teste de esconder esferas	44
Figura 8. Circuito funcional de neurônios monoaminérgicos.	50
Figura 9. Citocinas pró-inflamatórias e o eixo HPA.	55
Figura 10. Neuroplasticidade e resiliência celular nos distúrbios do humor.....	58
Figura 11. Modificações diferenciais no metabolismo energético cerebral avaliadas através da captação de ¹⁸ [F] fluorodeoxiglicose e alterações do fluxo sanguíneo cerebral em estudos de neuroimagem em pacientes deprimidos.	61
Figura 12. Estresse crônico brando e imprevisível em ratos como modelo animal potencial para a depressão, um paradigma que foi desenvolvido por Willner.....	66
Figura 13. Representação esquemática da mobilidade e imobilidade no teste do nado forçado	69
Figura 14. Mecanismos celulares e moleculares de ação das drogas antidepressiva (setas vermelhas).	76
Figura 15. Representação esquemática de possíveis efeitos da exposição cumulativa diferencial ao longo da vida.....	88
Figura 16. Classificação de nucleoides de acordo com dois sistemas.....	110
Figura 17. Diferentes vias de indução de mutagênese por drogas mutagênicas.	112
Figura 18. Células micronucleadas obtidas a partir do teste do micronúcleo in vivo e in vitro.	113

ARTIGO I

Figura 1. Imagem ilustrativa da <i>C. pubescens</i>	181
---	-----

ARTIGO III

Figure 1. Classification of comets in peripheral blood cells.	227
Figure 2. Erythrocytes of bone marrow.	228
Figure 3. Effects of treatment with EEFCP and cyclophosphamide (positive control) on the DNA damage frequency using the peripheral blood of female (a) and male (b) Wistar rats.	229
Figure 4. Effects of treatment with EEFCP and cyclophosphamide (positive control) on the counts of MN-PCEs using the bone marrow of female (a) and male (b) Wistar rats.....	229
Figure 5. Effects of treatment with EEFCP and cyclophosphamide (positive control) on the PCEs/NCEs ratio using the bone marrow of female (a) and male (b) Wistar rats.	230

DADOS SUPLEMENTARES

Figura 1. Análise histopatológica dos órgãos das fêmeas tratadas com o extrato etanólico dos frutos da <i>C. pubescens</i> na toxicidade subcrônica (H & E: 20X e 40X).	235
Figura 2. Análise histopatológica dos órgãos dos machos tratados com o extrato etanólico dos frutos da <i>C. pubescens</i> na toxicidade subcrônica (H & E: 20X e 40X).	235
Figura 3. Análise macroscópica de órgãos (pulmão, coração, fígado, baço e rim) das fêmeas tratadas com o extrato etanólico dos frutos da <i>C. pubescens</i> na toxicidade subcrônica.....	236
Figura 4. Análise macroscópica de órgãos (pulmão, coração, fígado, baço e rim) das fêmeas tratadas com o extrato etanólico dos frutos da <i>C. pubescens</i> na toxicidade subcrônica.....	237
Figura 5. Análise macroscópica de órgãos (pulmão, coração, fígado, baço e rim) dos machos tratados com o extrato etanólico dos frutos da <i>C. pubescens</i> na toxicidade subcrônica.	238
Figura 6. Análise macroscópica de órgãos (pulmão, coração, fígado, baço e rim) dos machos tratados com o extrato etanólico dos frutos da <i>C. pubescens</i> na toxicidade subcrônica.	239

LISTA DE TABELAS

REVISÃO DE LITERATURA

Tabela 1. Espécies de gabioba registradas no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.	28
Tabela 2. Metabólitos secundários isolados de diferentes espécies de <i>Campomanesia</i>	30
Tabela 3. Atividade biológica de diferentes espécies de <i>Campomanesia</i>	32
Tabela 4. Principais pesquisas <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> dirigidas para qualidade metodológica no campo da toxicologia.....	85

ARTIGO I

TABELA 1. Espécies de gabioba registradas no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.	180
TABELA 2. Metabólitos secundários isolados de diferentes espécies de <i>Campomanesia</i>	182
TABELA 3. Atividade biológica de diferentes espécies de <i>Campomanesia</i>	185

ARTIGO III

Table 1. Effects of treatment with ethanolic extract of <i>C. pubescens</i> fruits and cyclophosphamide (positive control) on the index and frequency DNA damage using the peripheral blood of female and male Wistar rats.....	224
Table 2. Frequency of mutant spots observed in the marked transheterozygous descendants of <i>Drosophila melanogaster</i> derived from the standard cross (ST) and high bioactivation cross (HB) after treatment with ethanolic extract of <i>C. pubescens</i> fruits.	226

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

3 α ,5 α -THDOC	3 α ,5 α -tetrahidrodesoxicortisterona
3 α ,5 α -THP	3 α ,5 α -tetrahidroprogesterona
5-HT	5-hidroxitriptamina
5-HT _{1A}	Receptor tipo 1A da 5-hidroxitriptamina
5-HT _{1B}	Receptor tipo 1B da 5-hidroxitriptamina
5-HT _{2A}	Receptor tipo 2A da 5-hidroxitriptamina
AC	Adenilil Ciclase
ACTH	<i>Adrenocorticotropic Hormone</i> (Hormônio Adrenocorticotrópico)
ADP	Adenosina Difosfato
ADT	Antidepressivos Tricíclicos
AGMT	<i>Guanine-DNA Methyl Transferases</i> (DNA-Guanina Metiltransferase)
AMP	Adenosina Monofosfato
AMPc	Adenosina Monofosfato Cíclica
AMPT	Alfa-metil- <i>p</i> -tirosina
ANP	<i>Atrial Natriuretic Peptide</i> (Peptídeo Natriurético Atrial)
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APA	<i>American Psychiatric Association</i> (Associação Americana de Psiquiatria)
ATC	<i>Acute Toxic Class</i> (Classe Tóxica Aguda)
ATF2	<i>Activating Transcription Factor 2</i> (Fator de Transcrição Ativado tipo 2)
ATF3	<i>Activating Transcription Factor 3</i> (Fator de Transcrição Ativado tipo 3)
ATF4	<i>Activating Transcription Factor 4</i> (Fator de Transcrição Ativado tipo 4)
ATFs	<i>Activating Transcription Factors</i> (Fatores de Transcrição Ativados)
ATP	Adenosina-5'-trifosfato
AVP	Arginina vasopressina
BD	<i>Bipolar Disorder</i> (Transtorno Bipolar)
BDNF	<i>Brain-Derived Neurotrophic Factor</i> (Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro)
BER	<i>Base Excision Repair</i> (Reparo por Excisão Base)
BTS	<i>British Toxicology Society</i> (Sociedade Britânica de Toxicologia)
CA	Campo Aberto
CaMK	Proteína quinase dependente de cálcio/calmodulina
CATs	Centros de Informação e Assistência Toxicológica
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CCDC	Cromatografia em Camada Delgada Comparativa
CCK	<i>Cholecystokinin</i> (Colecistocinina)
CG	Cromatografia Gasosa
CG-EM	Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massa
CL ₅₀	Concentração Letal em 50% da população
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CMS	<i>Chronic Mild Stress</i> (Estresse Brando Crônico)
CREB	Proteína de Ligação Responsiva ao AMPc
CREM	<i>cAMP Response Element Modulator</i> (Elemento Modulador de Resposta ao AMPc)
CRF	<i>Corticotrophin Releasing Factor</i> (Fator Liberador de Corticotrofinas)
CRF1	<i>Receptor Corticotrophin Releasing Factor 1</i> (Receptor tipo 1 do Fator Liberador de Corticotrofinas)

CS	Síndrome de Cockayne
DA	Dopamina
DAD-UV	<i>Diode Array Type of Ultravioleta</i> (Detector de Arranjo de Diodos na região do Ultravioleta e Visível)
DBS	<i>Deep Brain Stimulation</i> (Estimulação Cerebral Profunda)
DDT	Diclorodifeniltricloroetano
DL ₅₀	Dose letal em 50% da população
DM	Cromossomos <i>Double-Minutes</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DRN	<i>Dorsal Raphe Nucleus</i> (Núcleo da Rafe Dorsal)
DSBs	<i>DNA Damages like Double-Strand Breaks</i> (Danos no DNA do Tipo Quebra da Dupla Fita)
DSBs	<i>Double Strand Breaks</i> (Fragmentações de Cadeia Dupla)
DSM-IV	<i>Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders IV</i> (Manual diagnóstico e estatístico de transtornos mentais versão IV)
DSM-V	<i>Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders V</i> (Manual diagnóstico e estatístico de transtornos mentais versão V)
ECT	Eletroconvulsoterapia
ECVAM	<i>European Center for the Validation of Alternative Methods</i> (Centro Europeu de Validação de Métodos Alternativos)
EMA	<i>European Medicines Agency</i> (Agência Europeia de Medicamentos)
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
EtBr	Brometo de Etídio
FDA	<i>Food and Drugs Administration</i> (Administração de Alimentos e Drogas)
FDP	<i>Fixed Dose Procedure</i> (Procedimento de Dose Fixa)
FISH	<i>Fluorescent in situ Hybridization</i> (Hibridação <i>in situ</i> por Fluorescência)
FLR	<i>Flare</i>
FST	<i>Forced Swimming Test</i> (Teste do Nado Foçado)
GABA	Ácido γ -aminobutírico
GAT 1	<i>GABA transporter 1</i> (Transportador tipo 1 de GABA)
GGR	<i>Global Genome Repair</i> (Reparo Genômico Global)
G α i	Subunidade alfa da proteína G inibitória
G α s	Subunidade alfa da proteína G estimuladora
HPA	Hipotálamo-Pituitária-Adrenal
HRR	<i>Homologous Recombination Repair</i> (Reparo por Recombinação Homóloga)
ICCVAM	<i>Interagency of Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods</i> (Interagência do Comitê de Coordenação sobre a Validação de Métodos Alternativos)
ICER	<i>Inducible AMPc Early Repressor</i> (Repressor transcricional de AMPc)
ICH	<i>International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceutical for Human Use</i> (Conferência Internacional sobre Harmonização de Requisitos Técnicos para o Registro de Medicamentos para Uso Humano)
IF	Infravermelho
IFN- α	Interferon alfa
IL-1	Interleucina-1
IL-6	Interleucina-6
IRSN	Inibidor da Recaptação de Serotonina e Noradrenalina

IRSND	Inibidor da Recaptação de Serotonina, Noradrenalina e Dopamina
ISRSs	Inibidores Seletivos da Recaptação de Serotonina
ITSs	<i>Integrated Testing Strategies</i> (Estratégias Integradas de Testes)
IWGTP	<i>International Workshop on Genotoxicity Test Procedures</i> (Workshop Internacional sobre Procedimentos nos Testes de Genotoxicidade)
JaCVAM	<i>Japanese Center for the Validation of Alternative Methods</i> (Centro Japonês de Validação de Métodos Alternativos)
LCE	Labirinto Em Cruz Elevado
LCR	Líquido Cefalorraquidiano
LMPA	<i>Low Melting Point Agarose</i> (Agarose de Baixo Ponto de Fusão)
LOAEL	<i>Lowest-Observed-Adverse Effect-Level</i> (Menor Dose com Efeito Adverso Observado)
LOH	<i>Loss Of Heterozygosity</i> (Perda de heterozigidade)
LPS	Lipopolisacarídeo
MAO	Monoamina Oxidase
MAOi	Inibidores da Monoamina Oxidase
MAPK	<i>Mitogen Activated Protein Kinases</i> (Proteínas Quinases Ativadas por Mitógenos)
MB	Marble-Burying
MCH	<i>Melanin Concentrate Hormone</i> (Hormônio Concentrador de Melanina)
MCH 1	<i>Melanin Concentrate Hormone 1 Receptor</i> (Receptor tipo 1 de Hormônio Concentrador de Melanina)
MDD	<i>Major Depressive Disorder</i> (Transtorno Depressivo Maior)
MDR-PGP	Glicoproteína de Resistência Múltipla a Drogas
MGE	Eletroforese em Microgel
MMR	<i>Mismatch Repair</i> (Reparo por Incompatibilidade)
MNPCEs	<i>Micronucleated Polychromatic Erythrocytes</i> (Eritrócitos Policromáticos Micronucleados)
MTX	Metotrexato
MWH	<i>Multiple Wing Hairs</i> (Tricomas Múltiplos na Asa)
NCEs	<i>Normochromic Erythrocytes</i> (Eritrócitos Normocromáticos)
NE	Norepinefrina
NER	<i>Nucleotide Excisions Repair</i> (Reparo por Excisão de Nucleotídeos)
NGF	<i>Nerve Growth Factor</i> (Fator de Crescimento Nervoso)
NHEJ	<i>Non-Homologous End-Joining Repair</i> (Reparo por União de Extremidade Não-Homóloga)
NICEATM	<i>NTP Interagency Center of Evaluation of Alternative Toxicological Methods</i> (NTP Centro Interagência de Avaliação de Métodos Toxicológicos Alternativos)
NK1	<i>Neurokinin 1 Receptor</i> (Receptor tipo 1 de Neurocinina)
NMPA	<i>Normal Melting Point Agarose</i> (Agarose de Ponto de Fusão Normal)
NOAEL	<i>No-Observed Adverse Effect Level</i> (Dose de Efeitos Adversos não Observados)
NPY	Neuropeptídeo Y
OECD	<i>Organisation for Economic Co-operation and Development</i> (Organização para Cooperação de Desenvolvimento Econômico)
PAG	<i>Gray Region Periaqueductal</i> (Região Cinzenta Periaqueductal)
PBMCs	<i>Peripheral Blood Mononuclear Cells</i> (Células Mononucleares de Sangue Periférico)
PCEs	<i>Polychromatic Erythrocytes</i> (Eritrócitos Policromáticos)

PCNA	<i>Proliferating Cell Nuclear Antigen</i> (Antígeno Nuclear de Proliferação de Células)
PCr	Fosfocreatina
PET	<i>Positron-emission tomography</i> (Tomografia por Emissão de Pósitrons)
PI	Fosfatidilinositol
PI	Iodeto de Propídio
PKA	Proteína Quinase A
PKC	Proteína Quinase C
RACK1	<i>Receptor for Activated PKC kinase 1</i> (Receptor tipo 1 para quinase C ativada)
REACH	<i>Registration, Evaluation, Authorization and Restriction of Chemicals</i> (Regulamento de Registro, Avaliação, Autorização e Restrição de Substâncias Químicas)
RG	Receptor de Glicocorticoide
RMN	Ressonância Magnética
RNA _m	<i>Ribonucleic Acid messenger</i> (Ácido Ribonucleico mensageiro)
RPA	<i>Replication Protein A</i> (Proteína de Replicação A)
SARs	<i>Structure-Activity Relationships</i> (Relação Estrutura-Atividade)
SCGE	<i>Single Cell Gel Electrophoresis</i> (Eletroforese em Gel de Células Individualizadas)
SINITOX	Sistema Nacional de Informações Toxicofarmacológicas
SMART	<i>Somatic Mutation and Recombination Test</i> (Teste de Mutação e Recombinação Somática)
SNC	Sistema Nervoso Central
SSBs	<i>Simple Strand Breaks</i> (Fragmentações de Cadeia Simples)
TCR	<i>Transcription-Coupled Repair</i> (Reparo Acoplado a Transcrição)
TFIIH	<i>Transcription Factor IIIH</i> (Fator de Transcrição IIIH)
Th2	Linfócito T auxiliar 2
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral alfa
TPH	<i>Tryptophan Hydroxylase</i> (Triptofano Hidroxilase)
TPH-1	<i>Tryptophan Hydroxylase 1</i> (Triptofano Hidroxilase tipo 1)
TPH-2	<i>Tryptophan Hydroxylase 2</i> (Triptofano Hidroxilase tipo 2)
TPS	Teste de Preferência por Sacarose
TrkB	<i>Tropomyosin receptor kinase B</i> (Receptor de proteína Tirosina Quinase B)
UDP	“Up-and-Down” Procedure (Procedimento “Up-and-Down”)
UV	Ultravioleta
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i> (Fator de Crescimento Endotelial Vascular)
VTA	Área Tegmental Ventral
XPA	<i>Xeroderma Pigmentosum Complementation Group A</i> (Grupo de complementação A do Xeroderma Pigmentoso)
XPB	<i>Xeroderma Pigmentosum Complementation Group B</i> (Grupo de complementação B do Xeroderma Pigmentoso)
XPC	<i>Xeroderma Pigmentosum Complementation Group C</i> (Grupo de complementação C do Xeroderma Pigmentoso)
XPD	<i>Xeroderma Pigmentosum Complementation Group D</i> (Grupo de complementação D do Xeroderma Pigmentoso)
XPE	<i>Xeroderma Pigmentosum Complementation Group E</i> (Grupo de complementação E do Xeroderma Pigmentoso)

XPG
 β AR

Xeroderma Pigmentosum Complementation Group G (Grupo de
complementação G do Xeroderma Pigmentoso)
Receptores β -adrenérgicos

Avaliação da toxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade e dos efeitos antidepressivo e ansiolítico do extrato etanólico dos frutos da *Campomanesia pubescens* (D.C.) O. BERG em ratos

RESUMO

A *Campomanesia pubescens* (D.C.) O. BERG (guavira) é uma planta frutífera amplamente distribuída na América do Sul e utilizada pela população para fins medicinais e nutricionais, tendo importante valor econômico e cultural. Seus frutos contêm altos teores de flavonoides. No Sistema nervoso central (SNC), alguns flavonoides atuam como ansiolíticos e antidepressivos. Além de medicamentos, as plantas têm sido muito utilizadas como alimentos em todo o mundo. Sendo assim, o público consumidor das plantas deve conhecer as principais informações de segurança para evitar danos à saúde devido ao seu consumo irracional. A presente tese avaliou o potencial tóxico, através de testes de toxicidade aguda e a curto prazo, genotóxico e mutagênico, bem como os efeitos ansiolítico e antidepressivo do extrato etanólico dos frutos da *C. pubescens* (EEFCP). Para o teste de toxicidade aguda, ratos Wistar fêmeas receberam uma dose única de 2000 mg/kg de peso corporal do EEFCP por via oral e foram observados durante 14 dias. No teste de toxicidade a curto prazo, ratos Wistar machos e fêmeas receberam doses repetidas de 125, 250, 500 ou 1000 mg/kg de peso corporal do EEFCP por via oral, sendo tratados e observados durante 28 dias e, após esse período de tratamento, um grupo satélite e controle satélite permaneceram em observação por mais 14 dias. Para comprovar o efeito antidepressivo do EEFCP, ratos Wistar machos foram submetidos ao modelo de estresse brando crônico, ao teste de preferência por sacarose (TPS) e ao teste do nado forçado (FST). Para testar o efeito ansiolítico foram utilizados os modelos do Labirinto em Cruz Elevado (LCE), Campo Aberto (CA) e Marble-Burying (MB). No teste de toxicidade aguda, não foram observadas mortalidade nem alterações clínicas e nos pesos dos órgãos, indicando que a DL₅₀ é superior a 2000 mg/kg de peso corporal. No teste de toxicidade a curto prazo, as doses testadas não produziram alterações significativas nos parâmetros comportamentais, fisiológicos, hematológicos ou histopatológicos nos animais. Estes resultados demonstram a baixa toxicidade aguda e a curto prazo do EEFCP em ratos. Quanto aos estudos de genotoxicidade, nas condições experimentais utilizadas no presente trabalho, nossos resultados fornecem as primeiras evidências de que o EEFCP, administrado por via oral (gavagem), não é genotóxico para as células de sangue periférico e não possui ação clastogênica/aneugênica em células de medula óssea dos ratos. Além disso, os metabólitos de biotransformação do EEFCP não apresentam atividade genotóxica, como demonstrado pelo teste SMART nos descendentes do cruzamento de alta bioativação. Com relação aos efeitos no SNC, após 2 semanas de tratamento, imipramina 25 mg/kg, EEFCP 250 mg/kg e EEFCP 500 mg/kg reverteram o comportamento anedônico mensurado pelo TPS e reduziram significativamente o tempo de imobilidade dos animais submetidos ao estresse. Ademais, os tratamentos com diazepam 2 mg/kg, EEFCP 250 mg/kg e EEFCP 500 mg/kg aumentaram o percentual de entradas e tempo gasto nos braços abertos do LCE, além de aumentarem a locomoção, o número de *rearing* e reduzirem o tempo de *grooming* no CA. A análise química do EEFCP indicou alto teor de flavonoides e a análise comportamental revelou efeito antidepressivo e ansiolítico, sugerindo que estes fitoconstituintes podem estar envolvidos com estas ações no SNC.

Palavras-chave: Segurança. Genotoxicidade. Ansiolíticos. Antidepressivos. *Campomanesia pubescens*.

Evaluation of toxicity, genotoxicity and mutagenicity and of the antidepressant and anxiolytic effects of the ethanolic extract of the fruits of *Campomanesia pubescens* (D.C.) O. BERG in rats

ABSTRACT

Campomanesia pubescens (D.C.) O. BERG (guavira) is a fruit plant widely distributed in South America and used by the population for medicinal and nutritional purposes, having important economic and cultural value. Its fruits contain high levels of flavonoids. In the central nervous system (CNS), some flavonoids act as anxiolytics and antidepressants. In addition to medicines, plants have been widely used as food all over the world. Therefore, the consumers of the plants must know the main safety information to avoid damages to health due to their irrational consumption. The present thesis evaluated the toxic potential, through acute and short-term toxicity, and genotoxic and mutagenic potential, as well as the anxiolytic and antidepressant effects of *C. pubescens* (EEFCP) ethanolic extract. For the acute toxicity test, female Wistar rats received a single dose of 2000 mg / kg body weight of oral EEFCP and were observed for 14 days. In the short-term toxicity test, male and female Wistar rats received repeated doses of 125, 250, 500 or 1000 mg/kg body weight of oral EEFCP, being treated and observed for 28 days, and after that treatment period a satellite group and satellite control remained under observation for another 14 days. To confirm the antidepressant effect of the EEFCP, male Wistar rats are submitted to the chronic mild stress model, the sucrose preference test (SPT) and the forced swimming test (FST). In order to test the anxiolytic effects, the Elevated Plus-Maze (EPM), Open Field (OF) and Marble-Burying (MB) models were used. In the acute toxicity test, no mortality, clinical abnormalities and organ weights were observed, indicating that LD50 is greater than 2000 mg kg body weight. In the short-term toxicity test, the doses tested did not produce significant changes in the behavioral, physiological, hematological or histopathological parameters in the animals. These results demonstrate the low acute and short-term toxicity of EEFCP in rats. As to genotoxicity studies, in the experimental conditions used in the present study, our results provide the first evidence that orally administered (gavage) EEFCP is not genotoxic for peripheral blood cells and does not have clastogenic/aneugenic action in cells of bone marrow of rats. In addition, EEFCP biotransformation metabolites do not exhibit genotoxic activity, as demonstrated by the SMART test in the offspring of the high bioactivation cross. Regarding the CNS effects, after 2 weeks of treatment, imipramine 25 mg/kg, EEFCP 250 mg/kg and EEFCP 500 mg/kg reversed the anhedonic behavior measured by the SPT and significantly reduced the immobility time of animals under stress. In addition, treatment with diazepam 2 mg/kg, EEFCP 250 mg/kg and EEFCP 500 mg/kg increased the percentage of inputs and time spent on the open arms of the EPM, in addition to increasing locomotion, rearing numbers and reducing time grooming in OF. The chemical analysis of the EEFCP indicated a high flavonoid content and the behavioral analysis revealed antidepressant and anxiolytic effects, suggesting that these phytochemicals may be involved with these actions in the CNS.

Keywords: Safety. Genotoxicity. Anxiolytics. Antidepressants. *Campomanesia pubescens*.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	22
2. REVISÃO DE LITERATURA	24
2.1. A família <i>Myrtaceae</i>	24
2.2. O gênero <i>Campomanesia</i> e a espécie <i>Campomanesia pubescens</i>	26
2.2.1. Composição química	29
2.2.2. Dados farmacológicos e toxicológicos	32
2.3. Ansiedade	35
2.3.1. Modulações neuroquímicas da ansiedade	36
2.3.2. Modelos animais para avaliação da atividade ansiolítica	39
2.3.2.1. Teste do labirinto em cruz elevado (LCE)	40
2.3.2.2. Teste do campo aberto (CA)	41
2.3.2.3. Teste de esconder esferas (<i>Marble-Burying Test</i>)	42
2.3.3. Tratamentos atuais da ansiedade	44
2.4. Depressão	47
2.4.1. Teorias neurobiológicas da depressão	48
2.4.1.1. O papel das monoaminas na depressão	48
2.4.1.2. O eixo HPA, estresse e o sistema neuroendócrino	53
2.4.1.3. Depressão e o processo inflamatório	54
2.4.1.4. As neurotrofinas e a depressão: Alterações da neuroplasticidade e correlação com as outras hipóteses etiopatológicas	57
2.4.1.5. Anormalidades de neuroimagem nos distúrbios do humor e a teoria mitocondrial da depressão	60
2.4.2. Modelos animais no estudo da depressão	62
2.4.2.1. Modelos animais baseados na exposição ao estresse	63
2.4.2.1.1. Estresse social	63
2.4.2.1.2. Estresse brando crônico e imprevisível	64

2.4.3. Teste do nado forçado	68
2.4.4. Tratamento farmacológico da depressão	72
2.4.4.1. Mecanismos de ação das principais drogas antidepressivas.....	74
2.4.4.1.1. Potencialização da neurotransmissão monoaminérgica	74
2.4.4.1.2. Mecanismos de ação antidepressivos pós-transducionais e neurogênese.....	75
2.4.4.1.3. Mecanismo de ação das drogas que atuam no eixo HPA.....	80
2.4.4.2. Resistência ao tratamento antidepressivo	81
2.5. Tratamento da ansiedade e depressão com plantas medicinais	82
2.6. Toxicologia: a qualidade metodológica dos estudos	84
2.6.1. Conceitos básicos em toxicologia.....	87
2.6.1.1. Frequência e duração da exposição	87
2.6.1.2. Rotas de exposição.....	88
2.6.1.3. Efeitos deletérios sobre a saúde.....	89
2.6.1.4. Medidas em toxicologia.....	90
2.6.2. Estudo da toxicidade oral aguda	91
2.6.3. Estudo da toxicidade oral de doses repetidas.....	94
2.6.4. Genotoxicidade e mutagenicidade.....	96
2.6.4.1. Mecanismos moleculares envolvidos na indução de aberrações cromossômicas	98
2.6.4.1.1. Reparo direto	98
2.6.4.1.2. Reparo por excisão de bases (BER)	99
2.6.4.1.3. Reparo por excisão de nucleotídeo (NER).....	99
2.6.4.1.4. Reparo por incompatibilidade.....	100
2.6.4.1.5. Reparo de aberrações cromossômicas	101
2.6.4.2. Estudo da genotoxicidade e mutagenicidade	102
2.6.4.2.1. Ensaio do cometa	104
2.6.4.2.1.1. Princípios técnicos e recomendações para o ensaio do cometa em pH alcalino	107

2.6.4.2.2. Ensaio do micronúcleo	110
2.6.4.2.2.1. Princípios técnicos e recomendações para o teste do micronúcleo	113
2.6.4.2.3. Ensaio do cometa integrado ao teste do micronúcleo e ao teste de toxicidade oral de doses repetidas por 28 dias.....	115
2.6.4.2.4. Teste para detecção de Mutação e Recombinação Somática (SMART).....	117
2.6.5. Toxicidade <i>versus</i> segurança das plantas medicinais	119
3. OBJETIVOS	122
3.1. Geral	122
3.2. Específicos	122
4. CONCLUSÕES.....	123
4.1. Geral	123
4.2. Específicas	123
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	125
6. APÊNDICES	170
6.1. Artigo I: Aspectos farmacológicos, toxicológicos, químicos e culturais da guavira (<i>Campomanesia pubescens</i> (D.C.) O. BERG): uma revisão sistemática	170
6.2. Artigo II: Preclinical safety evaluation of the ethanolic extract from guavira fruits (<i>Campomanesia pubescens</i> (D.C.) O. BERG) in experimental models of acute and short-term toxicity in rats	193
6.3. Artigo III: Preclinical safety evaluation of the ethanolic extract from <i>Campomanesia pubescens</i> (D.C.) O. BERG (guavira) fruits: Analysis of genotoxicity and clastogenic effects	194
6.4. Artigo IV: The ethanolic extract obtained from <i>Campomanesia pubescens</i> (D.C.) O. BERG fruits exerts anxiolytic and antidepressant effects on chronic mild stress model and on anxiety models in Wistar rats: behavioral evidences.	231
7. ANEXOS	232
7.1. Parecer de aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais.....	232
7.2. Carta de aceite do artigo submetido ao periódico <i>Nutritional Neuroscience</i>	233
7.3. Carta de aceite do artigo submetido ao periódico <i>Food and Chemical Toxicology</i> .	234

7.2. Material suplementar	235
--	------------

1. INTRODUÇÃO

Os distúrbios que envolvem a saúde mental como, por exemplo, ansiedade e depressão, são graves problemas de saúde pública e um fator redutor da qualidade de vida para os pacientes em todo o mundo (ARCHER *et al.*, 2012; GUNN *et al.*, 2010).

O transtorno depressivo maior (MDD, do inglês *Major Depressive Disorder*) é uma doença complexa e heterogênea com etiopatogenia multifatorial que pode atuar em diferentes níveis do organismo humano (psicológico, biológico, genético e social). Os mecanismos envolvidos no surgimento de episódios de ansiedade e depressão ainda não são totalmente compreendidos, no entanto, já está bem estabelecida sua relação com as doenças cardiovasculares, osteoporose, diabetes e isquemia cerebral (BANÁS *et al.*, 2005; JABŁOŃSKI *et al.*, 2008; LABUZ-ROSZAK *et al.*, 2013; ZARDAWI, 2013).

Os distúrbios de ansiedade são os transtornos psiquiátricos mais frequentes entre estes grupos de doenças denominados transtornos de humor, com maior prevalência entre as mulheres (KESSLER *et al.*, 2012). O tipo mais comum de ansiedade é a fobia específica, com prevalência de 15,6 % entre os indivíduos que desenvolvem esse distúrbio. Embora seja uma doença grave, os pacientes que sofrem deste transtorno raramente procuram tratamento (APA, 2013).

Pesquisas prévias sobre a sobrevida dos pacientes demonstraram que os distúrbios de ansiedade desenvolvem um curso crônico e global, com taxa de recuperação relativamente baixa e uma alta probabilidade de recorrência (BRUCE *et al.*, 2005). Tais distúrbios afetam negativamente a qualidade de vida e a manutenção da vida diária dos pacientes, com consequências sociais, pessoais e econômicas comparáveis às da depressão maior (BERGER *et al.*, 2011; WITTCHEN *et al.*, 2000).

Estudos vêm sendo realizados com o intuito de ampliar e melhorar a compreensão da etiologia da ansiedade e depressão (BERTON; NESTLER, 2006; D'AQUILA; BRAIN; WLLNER, 1994; FERNANDEZ *et al.*, 2009; FREEMAN; FREEMAN; MCELROY, 2002; KANDEL, 2000; PITTENGER; DUMAN, 2008; RUHÉ; MASON; SCHENE, 2007; SCHMIDT; DUMAN, 2010), bem como a investigação em busca de novos agentes bioativos para o desenvolvimento de tratamentos que tragam maiores benefícios, com riscos reduzidos e acesso maximizado aos pacientes (BARETTA; ANDREATINI, 2012; CALIXTO, 2005; CALIXTO; SIQUEIRA-JR, 2008; PEREIRA; ANDREATINI, 2013).

Com base nesse contexto, as pesquisas com plantas medicinais e produtos naturais que apresentem efeitos ansiolíticos e antidepressivos exibem importância fundamental na busca de novas terapias para os distúrbios do humor. Já está bem estabelecido que cerca de 25% dos fármacos prescritos no mundo derivam de plantas utilizadas na medicina tradicional (SAHOO; MANCHIKANTI; DEY, 2010). Tais plantas, utilizadas popularmente durante anos, constituem a fonte preferencial de material botânico para a investigação de novos medicamentos eficazes na terapêutica (FAJEMIROYE *et al.*, 2016).

Alguns medicamentos à base de plantas já foram aprovados por órgãos reguladores para o tratamento de transtornos mentais. No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) inclui os produtos derivados da *Plassiflora incarnata*, *Piper methysticum*, *Valeriana officinalis* e *Cimicifuga racemosa* para o tratamento de transtornos de ansiedade e/ou depressão. Assim como a ANVISA, a Agência Europeia de Medicamentos (EMA, do inglês, European Medicines Agency) incluiu o *Hypericum perforatum* L. (St. John's Wort, SJW), a *Melissa officinalis* L. (folha de Melissa), *V. officinalis* L. (Raiz de Valeriana), entre outros, na lista de medicamentos à base de plantas para o tratamento do estresse mental e distúrbios do humor (EMA, 2018). No entanto, informações importantes de farmacovigilância e toxicovigilância para utilização segura dessas e outras plantas ainda são muito restritas (ANVISA, 2015).

Atualmente, apenas uma planta da família *Myrtaceae* tem sido empregada clinicamente no tratamento de desordens psiquiátricas, como ansiedade e depressão, a *Pimenta pseudocaryophyllus*, popularmente conhecida como pau-cravo, louro-cravo, louro, craveiro (PAULA *et al.*, 2008). Isso demonstra a necessidade de pesquisas com plantas dessa família.

As espécies do gênero *Campomanesia*, pertencentes a família *Myrtaceae*, são amplamente encontradas na região central do Brasil, no Uruguai, Paraguai e Argentina. No Mato Grosso do Sul é muito utilizada *in natura* e na forma de doces, sorvetes, refrescos, licores e, muitas vezes, como flavorizantes em destilados alcoólicos (VALLILO *et al.*, 2008). Estudos demonstraram que as folhas da espécie *Campomanesia pubescens* (D.C.) O. BERG (guavira), colhidas em áreas nativas de Mato Grosso do Sul (MS), apresentaram efeito anti-inflamatório devido à redução dos monócitos circulantes (GUERRERO *et al.*, 2010) e efeito antioxidante frente ao método do β -caroteno/ácido linoleico (CARDOSO *et al.*, 2008) e do 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH) (ROCHA; MORAIS; CHANG, 2011). Além disso, também é utilizada pela comunidade local com

outras finalidades terapêuticas, dentre elas, ação depurativa, antidiarreica e redução dos níveis sanguíneos de colesterol (BALLVE *et al.*, 1995).

Embora as plantas medicinais possam apresentar importantes efeitos farmacológicos, em muitos casos possuem efeitos tóxicos, o que torna-se particularmente importante e grave, pois a maior parte dos usuários fazem seu uso indiscriminado e irracional (GUERRERO *et al.*, 2010). Nesse contexto, ainda são poucos os estudos com plantas em que foram avaliadas a segurança e a atividade biológica frente aos distúrbios do humor, especialmente da espécie *C. pubescens*. Sendo assim, pesquisadores devem empenhar-se em demonstrar o potencial de toxicidade aguda e a curto prazo, bem como os potenciais efeitos genotóxicos e mutagênicos dos frutos da guavira, amplamente utilizados pela população da América do Sul.

A partir do exposto, os aspectos que justificam a pesquisa da presente tese são: 1) A necessidade de novas terapias ansiolíticas e antidepressivas mais eficazes, com índices de efeitos adversos reduzidos e acesso à população maximizado; 2) O potencial nutracêutico que os frutos da *C. pubescens* possuem perante a população da América do Sul e; 3) A necessidade de estudos aprofundados sobre a segurança durante o consumo da planta. Sendo assim, o principal objetivo deste estudo foi avaliar o potencial efeito antidepressivo e ansiolítico, bem como toxicidade aguda, a curto prazo, genotoxicidade e mutagenicidade do extrato etanólico da *Campomanesia pubescens* em ratos Wistar, com base no que preconiza as agências reguladoras *Food and Drugs Administration* (FDA), *Organisation for Economic Co-operation and Development* (OECD) e Agência de Vigilância Sanitária (ANVISA).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. A família *Myrtaceae*

Myrtaceae representa uma das maiores famílias da flora brasileira, sendo encontrados mais de 130 gêneros e 4000 espécies de plantas distribuídas entre árvores e arbustos. Nas Américas essa família é conhecida, principalmente, por suas árvores frutíferas (LORENZI; SOUZA, 2008). As espécies desta família possuem folhas simples com glândulas oleíferas, flores polistêmones, ovário mediano a ínfero, floema interno e ornamentos através de pontuações que seguem nos vasos do xilema (GOMES *et al.*, 2009).

Muitas plantas desta família estão distribuídas no cerrado brasileiro. O cerrado é um dos ecossistemas do Brasil que está reduzindo devido à exploração irracional feita pelo homem. Muitos esforços têm sido empregados para manter e conservar essas áreas, devido à sua importância na biodiversidade vegetal e fauna (OLIVEIRA *et al.*, 2012). Na flora do cerrado são encontradas espécies frutíferas com potencial importante na utilização agrícola, terapêutica e em pesquisas, visto que são utilizadas pela população local de maneira tradicional e econômica, como é o caso da *C. pubescens*.

Geralmente, os frutos encontrados nas plantas da família *Myrtaceae* são consumidos *in natura* e na forma de doces, sorvetes, refrescos, licores e, muitas vezes, como flavorizantes em destilados alcoólicos (figura 1), e o consumo aumenta de maneira paulatina devido ao valor nutritivo, econômico e aos efeitos terapêuticos. As indústrias de produtos lácteos e sucos vêm explorando cada vez mais a utilização dos frutos para produção de polpas congeladas, o que aumenta o interesse, tanto de produtores, como de consumidores. Informações acerca das características químicas, valor nutricional e terapêutico, bem como segurança durante o consumo, são ferramentas importantes para formulação de novos produtos, incentivo ao crescimento econômico e avaliação do consumo desses frutos (KUSKOSKI *et al.*, 2006; ROCHA; MORAIS; CHANG, 2011).



Figura 1. Frutos da *C. pubescens* utilizada como flavorizante na cachaca. FONTE: O autor.

Entre as mirtáceas brasileiras há espécies de importância medicinal cujas atividades biológicas incluem: 1) Antioxidante (*Eugenia caryophyllata*, *Eugenia involucrata*, *C. pubescens*, *Campomanesia xanthocarpa*, *Psidium cattleianum*)

(CARDOSO *et al.*, 2008; HALDER *et al.*, 2011; MARIN *et al.*, 2008; ROCHA; MORAIS; CHANG, 2011); 2) Antimicrobiana (*Eugenia jambolana*, *Syzygium aromaticum*) (JASMINE *et al.*, 2010; MACHADO, 2010); 3) Hipoglicemiante (*Campomanesia xanthocarpa*, *Eugenia jambolana*) (BIAVATTI *et al.*, 2004; KUMAR *et al.*, 2010); 4) Anti-inflamatória e antinociceptiva (*Eugenia discifera*, *Eugenia candolleana*) (GUIMARÃES *et al.*, 2009; MARIDASS, 2008); 5) Imunomodulatória (*C. pubescens*, *Syzygium aromaticum*) (CARRASCO, 2009; GUERRERO *et al.*, 2010) e; 6) Hepatoprotetora (*Eugenia jambolana*) (SISODIA; BHATNAGAR, 2009).

Muitas espécies dessa família de plantas, infelizmente, vêm desaparecendo da natureza antes mesmo que tenham sido estudadas e, desenvolvidos conhecimentos básicos sobre a sua biologia, perfil fitoquímico, efeito biológico, eficácia farmacológica ou perfil toxicológico (GRESSLER; PIZO; MORELLATO, 2006).

2.2. O gênero *Campomanesia* e a espécie *Campomanesia pubescens*

Atualmente são conhecidas cerca de 80 espécies do gênero *Campomanesia* das quais 11 são frutíferas (MADALOSSO *et al.*, 2011). Destas, 25 espécies encontram-se do México até a Argentina e 15 são nativas do Brasil onde estão distribuídas, principalmente, da região centro-oeste ao sul (PEIXOTO *et al.*, 2005). Além disso, o gênero é representado por árvores e arbustos distribuídos da região norte da Argentina até Trinidad e das costas brasileiras até o Peru, Equador e Colômbia. Com relação ao tipo de solo necessário para o seu desenvolvimento, são pouco exigentes e, algumas espécies, crescem em solos pobres em nutrientes como, por exemplo, a *C. adamantium*. Os frutos das *Campomanesias* exibem importância fundamental para o equilíbrio da fauna, visto que é consumida por um grande número de pássaros, pequenos mamíferos, peixes e répteis e são os principais agentes de disseminação das sementes das espécies deste gênero. A floração e maturação dos frutos ocorrem entre os meses de agosto a dezembro. Os frutos são arredondados, apresentam coloração que variam de verde-escuro/claro até amarelo, como demonstrado na figura 2, e disseminam aroma adocicado e agradável (VALLILO *et al.*, 2006).

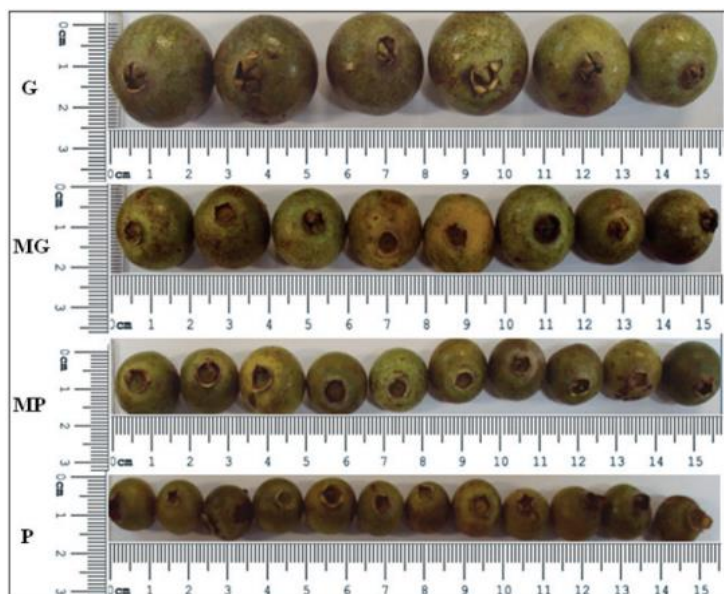


Figura 2. Frutos de gabirola (*Campomanesia adamantium*) classificados pelo tamanho em: grande (G), médio grande (MG), médio pequeno (MP) e pequeno (P). FONTE: DRESCH *et al.*, 2013.

No Estado do Mato Grosso do Sul a *C. pubescens* é conhecida como guavira, no entanto, no ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento está registrada como “gabirola” e suas variações. Grande parte das gabirolas estão inseridas na família *Myrtaceae* e pertencem ao gênero *Campomanesia* (PEIXOTO *et al.*, 2005). Uma exceção de gabirola que não faz parte da família *Myrtaceae* é a *Vitex multinervis Schauer*, conhecida popularmente como gabirola-brava pertencente à família *Verbenaceae*. Outras estão inseridas na família *Myrtaceae*, no entanto, não pertencem ao gênero *Campomanesia*, como é o caso da *Abbevillea gabirola Berg* (gabirola de cachorro) e a *Abbevillea chrysophylla Berg* (gabirola nativa) (SOUSA *et al.*, 2004).

Encontram-se registradas no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento 14 espécies de gabirola, descritas na tabela 1.

Tabela 1. Espécies de gabioba registradas no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.

ESPÉCIES DE GABIROBEIRA			
Nome Científico	Nome Comum	Nº De Registro	Data De Registro
<i>Campomanesia adamantium</i> (Cambess.) O.Berg	Gabioba-adamantium	23633	25/06/2008
<i>Campomanesia aromatica</i> (Aubl.) Griseb	Guabiraba	35132	19/01/2016
<i>Campomanesia eugenioides</i> (Cambess.) D.Legrand	Gabioba-do-amazonas	23634	25/06/2008
<i>Campomanesia guaviroba</i> (DC) Kiaersk	Guabioba-laranja, Guabioba	35133	19/01/2016
<i>Campomanesia guazumifolia</i> (Cambess.) O. Berg	Gabioba-capoteira	23635	25/06/2008
<i>Campomanesia hirsuta</i> Gardner	Guabioba-grande	35135	19/01/2016
<i>Campomanesia laurifolia</i> Gardner	Gabioba-laurifolia	23636	25/06/2008
<i>Campomanesia lineatifolia</i> Ruiz & Pav.	Gabioba-da-folha-fina	23637	25/06/2008
<i>Campomanesia neriiflora</i> (O. Berg) Nied.	Gabioba-branca	23638	25/06/2008
<i>Campomanesia phaea</i> (O. Berg) Landrum	Gabioba-cambuci	23639	25/06/2008
<i>Campomanesia pubescens</i> (DC.) O. Berg	Gabioba-pilosa	23640	25/06/2008
<i>Campomanesia reitziana</i> D. Legrand	Gabioba-da-gradá	23641	25/06/2008
<i>Campomanesia schlechtendahlana</i> (O.Ber) Nied.	Gabioba-do-campo	23642	25/06/2008
<i>Campomanesia xanthocarpa</i> O. Berg	Gabioba-de-árvore	23643	25/06/2008

FONTE: (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, 2018).

A espécie *C. pubescens* é um arbusto caducifólio que mede de 1 a 2 metros de altura (figura 3) (LORENZI *et al.*, 2006). O caule desta espécie é do tipo piloso, folhas

oblongas, membranáceas e pilosas nas duas faces, flores isoladas, axilares, brancas, sépalas agudas, triangulares e bractéolas lineares (SOUSA *et al.*, 2004).

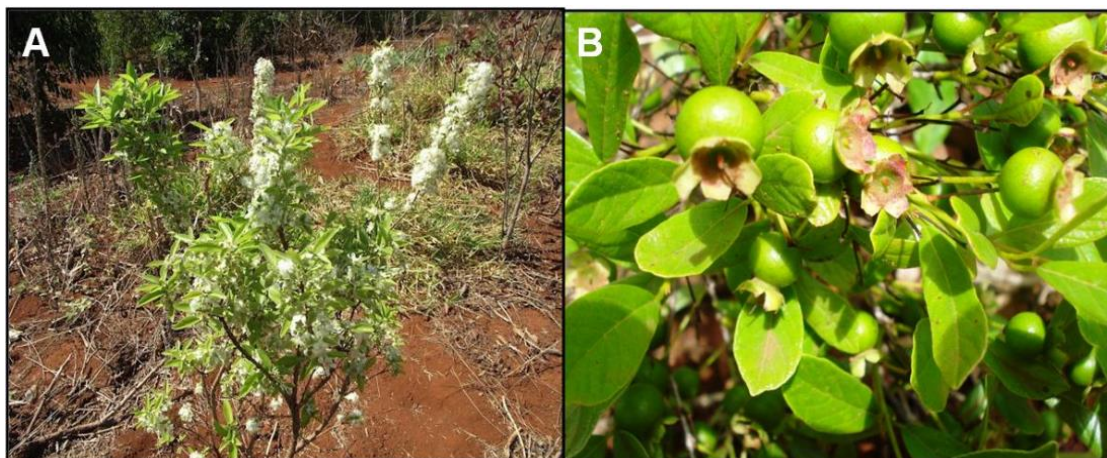


Figura 3. Imagem ilustrativa da *C. pubescens*.

A. Arbusto e flores da *C. pubescens*; **B.** Frutos jovens esverdeados, que tornam-se amarelados quando na fase de maturação. FONTE: PLANTAS DO CERRADO, 2018.

Geralmente, a *C. pubescens* se diferencia das demais gabirobeiras arbustivas por ter pedúnculos densamente pubescentes (termo botânico utilizado para definir parte da planta que é coberta por pelos finos) e, caracteristicamente, mais alongados que o broto floral. Além disso, possuem folhas imaturas por ocasião da antese, ou seja, no momento da abertura dos botões florais, coriáceas quando maduras e pubescentes na face anterior (LORENZI; SOUZA, 2008).

2.2.1. Composição química

Os metabólitos de origem vegetal são classificados em primários e secundários. A composição e distribuição de metabólitos vegetais varia de uma planta para outra e a sua ausência não compromete a sobrevivência das células. Os metabólitos secundários podem ser classificados em três grandes grupos, de acordo com a sua rota biossintética: 1) Compostos fenólicos, que são substâncias aromáticas que contêm um ou mais grupamentos hidroxila (-OH); 2) Terpenos e esteroides, formados a partir de unidades isoprenoídicas que possuem cinco átomos de carbono e; 3) Alcaloides, que são bases orgânicas que contêm um átomo de nitrogênio usualmente ligados a estruturas cíclicas de cinco ou seis átomos de carbono. Além desses compostos, existem um grande número de

outros metabólitos que não se enquadram nessa classificação geral (HARBONE; BEXTER; MOSS, 1999).

Acredita-se que muitas das atividades biológicas das plantas do gênero *Campomanesia* podem ser atribuídas, principalmente, devido à presença de metabólitos secundários produzidos pelas plantas, como, por exemplo, terpenos, flavonoides, champanonas, taninos e saponinas. Muitas dessas substâncias vem sendo investigadas nos laboratórios mundo afora e já foram identificadas e isoladas (tabela 2)

Tabela 2. Metabólitos secundários isolados de diferentes espécies de *Campomanesia*.

Espécie	Metabólitos secundários identificados e/ou isolados	Técnica utilizada	Material Vegetal	Referência
<i>C. adamantium</i>	Flavanonas e chalconas (6 compostos)	CLAE-DAD-UV	Extrato fração acetato de etila (frutos)	(PAVAN <i>et al.</i> , 2009)
<i>C. adamantium</i>	Monoterpenos (limoneno, α -pineno e β -pineno) e sesquiterpenos (biclogermacreno e globulol)	CG-EM	Óleo essencial	(COUTINHO <i>et al.</i> , 2009)
<i>C. guazumifolia</i> <i>C. pubescens</i> <i>C. xanthocarpa</i>	Quercetrina, miricetina, 3-O-ramnoglicosídeo e rutina.	CLAE	Extrato (folhas)	(SCHMEDA-HIRSCHMANN, 1995)
<i>C. lineatifolia</i>	Champanonas A, B e C	UV, RMN e IF	Extrato metanólico (sementes)	(BONILLA <i>et al.</i> , 2005)
<i>C. lineatifolia</i>	Componentes voláteis terpenoides, álcoois, ácidos carboxílicos, ésteres, C13-norisoprenoides, Compostos furânicos β -trictonas e	CG e CG-EM	Extrato pentano:diclorometano (1:1) (frutos, sementes e folhas)	(OSORIO <i>et al.</i> , 2006)

	champanonas(150 compostos)			
<i>C. lineatifolia</i>	Quercitrina, catequina, flavonoides e taninos	CLAE, UV, RMN	Extrato etanólico e fração acetato de etila (folhas)	(BARBOSA, 2009)
<i>C. pubescens</i>	Sesquiterpenos e hidrocarbonetos oxigenados (23 compostos) e β -sitosterol	CG-EM	Extrato hexânico (folhas)	(CARDOSO <i>et al.</i> , 2008)
	Fração hexânica: 1 2-hidroxi-3'-metil-4',6'-dimetoxichalcona e; 2 7-hidroxi-5-metoxi-6-metilflavanona.			
<i>C. pubescens</i>	Fração acetato de etila: 3 5-hidroxi-7-metoxi-8-metilflavanona; 4 2',4'-dihidroxi-3',5'-dimetil-6'-metoxichalcona e; 5 2',4'-dihidroxi-5'-metil-6'-metoxichalcona.	CCDC e RMN	Extrato etanólico (frutos)	O autor
<i>C. xanthocarpa</i>	Flavonoides, saponinas e taninos	CCD	Extrato hidroetanólico (folhas)	(MARKMAN; BACCHI; KATO, 2004)
<i>C. xanthocarpa</i>	Flavonoides, saponinas e taninos	CCD	Extrato seco (folhas)	(KLAFKE <i>et al.</i> , 2010)

LEGENDA: CCD: cromatografia em camada delgada; CCDC: cromatografia em camada delgada comparativa; CG-EM: cromatografia gasosa acoplada à espectrofotômetro de massas; CLAE: cromatografia líquida de alta eficiência, DAD: detector de arranjo de diodos; IV: espectrofotometria no infravermelho; RMN: ressonância magnética nuclear UV: espectrofotometria no ultravioleta.

Atualmente, já são conhecidas muitas estruturas fenólicas, sendo que a maioria destas é representada pelos flavonoides, que são biossintetizados a partir de uma unidade fundamental denominada 2-fenilbenzopirona que apresenta 2 anéis fenólicos (A e B), ligas por uma ponte de 3 átomos de carbono (anel C) (HARBONE; BEXTER; MOSS, 1999). Estas estruturas estão representadas na figura 4.

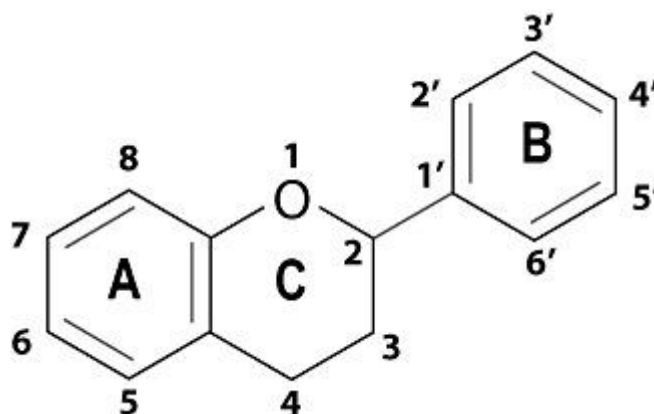


Figura 4. Estrutura básica de um flavonoide. FONTE: HEIM; TAGLIAFERRO; BOBILYA, 2002.

Já está bem estabelecido que os flavonoides apresentam uma importante ação antioxidante, no entanto, há evidências de que essas substâncias possam desenvolver atividade biológica em vários sistemas como, por exemplo, a permeabilidade capilar, processos secretórios da resposta inflamatória e a atividade sobre enzimas, receptores ou carreadores (HODEK; TREFIL; STIBOROVÁ, 2002; MOTA *et al.*, 2009; NOROOZI, 1998).

2.2.2. Dados farmacológicos e toxicológicos

Poucos estudos foram desenvolvidos com o objetivo de investigar potenciais efeitos farmacológicos da *C. pubescens*, sendo esta uma das justificativas da presente tese. No entanto, pesquisas com outras espécies de *Campomanesia* demonstraram efeitos farmacológicos promissores e incentivam a pesquisa com a planta.

Os estudos sobre o gênero *Campomanesia* que foram publicados demonstrando atividades biológicas distintas estão demonstrados na tabela 3.

Tabela 3. Atividade biológica de diferentes espécies de *Campomanesia*.

Espécie	Atividade Biológica e Toxicidade	Material Vegetal	Referência
<i>C. adamantium</i>	Atividade anti- <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Extrato dos frutos – fração acetato de etila	(PAVAN <i>et al.</i> , 2009)
<i>C. adamantium</i>	Antioxidante e antimicrobiana contra <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> e <i>Candida albicans</i>	Óleo essencial	(COUTINHO <i>et al.</i> , 2009)
<i>C. adamantium</i>	Antimicrobiana contra <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella setubal</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> e <i>Candida albicans</i>	Extrato hexânico (frutos)	(CARDOSO <i>et al.</i> , 2010)
<i>C. pubescens</i>			
<i>C. lineatifolia</i>	Antioxidante	Extrato etanólico e fração acetato de etila (folhas)	(BARBOSA, 2009)
	Antioxidante.		
<i>C. pubescens</i>	Toxicidade aguda com microcrustáceo indicando segurança nas doses testadas.	Extrato hexânico (folhas)	(CARDOSO <i>et al.</i> , 2008)
	Ansiolítica e antidepressiva.		
<i>C. pubescens</i>	Toxicidade aguda, a curto prazo, genotoxicidade e mutagenicidade.	Extrato etanólico dos frutos	O autor
	Antiulcerogênica em ratos.		
<i>C. xanthocarpa</i>	Toxicidade aguda em ratos indicando segurança nas doses testadas.	Extrato hidroetanólico (folhas)	(MARKMAN; BACCHI; KATO, 2004)

	Redução do colesterol total (TC) e LDL em pacientes hipercolesterolêmicos.		
<i>C. xanthocarpa</i>	Antioxidante e inibitória da enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A redutase <i>in vitro</i> .	Extrato seco (folhas)	(KLAFKE <i>et al.</i> , 2010)
<i>C. xanthocarpa</i>	Redução do ganho de massa corporal e redução da glicemia em ratos submetidos à dieta hipercalórica.	Extrato aquoso (folhas)	(BIAVATTI <i>et al.</i> , 2004)

Com o intuito de demonstrar a toxicidade do extrato hexânico das folhas de *C. pubescens* Cardoso e colaboradores (2008) utilizaram um modelo de toxicidade onde ovos de *Artemia salina* foram colocados em béquer contendo água marinha artificial, ficando sob luz e oxigenação por 24 horas. Após esse período, em média 10 larvas recém eclodidas foram inseridas em frascos na concentração de 550, 1100 e 2200 µg/mL do extrato dissolvidos em água marinha artificial e após 24 horas foram contadas. Os dados obtidos exibiram um perfil não tóxico para o extrato hexânico, visto que não apresentou mortalidade dos microcrustáceos na concentração de 2200 µg/mL.

Outro estudo de toxicidade, porém com ratos, demonstrou que o extrato hidroalcoólico das folhas de *C. xanthocarpa* não apresentou efeito tóxico após a administração da dose de 5000 mg/kg (MARKMAN; BACCHI; KATO, 2004).

Apesar de muito importantes, estes estudos não atendem o que é preconizado pelas agências reguladoras com relação a avaliação da segurança para o consumo humano. Os estudos não clínicos de segurança propostos pelas ANVISA incluem: 1) Estudos de toxicidade de dose única (Aguda); 2) Toxicidade de doses repetidas; 3) Toxicidade reprodutiva; 4) Genotoxicidade, tolerância local e carcinogenicidade. Além destes, também estão propostos pela ANVISA os estudos de interesse na avaliação da segurança farmacológica e toxicocinética (Administração, Distribuição, Metabolismo e Excreção – ADME). Outros estudos que avaliam a segurança da substância teste poderão ser necessários conforme o caso. Os dados de segurança que são obtidos nessa etapa dos estudos dão suporte às Fases 1, 2 e 3 da Pesquisa Clínica (ANVISA, 2013).

2.3. Ansiedade

A ansiedade é um estado de medo excessivo caracterizado por hiperatividade motora simpatocomimética, apreensão e síndrome da vigilância. A observação mais comum é uma resposta aguda ao estresse apresentando um estado de excitação ou medo anormal ou exagerado (APA, 2013; NINAN, 2002). Geralmente, a ansiedade é uma resposta adaptativa a estímulos perigosos, os quais podem perturbar a homeostase. No entanto, quando se torna desproporcional em intensidade, crônica e/ou irreversível ou não relacionada ao estímulo que normalmente provoca ansiedade, manifesta-se como distúrbio debilitante apresentando-se sob a forma de fobia, ataques de pânico, transtorno de estresse pós-traumático, transtorno de ansiedade social ou distúrbios de ansiedade generalizada. Os estados de ansiedade são controlados por ambos mecanismos neuroquímicos inibitórios e excitatórios que bloqueiam ou ativam os estados de ansiedade. Estes sistemas neuroquímicos exibem efeitos sobre áreas corticais e subcorticais do cérebro que são importantes para a mediação dos sintomas associados aos distúrbios de ansiedade. Os circuitos cerebrais envolvidos nesse distúrbio podem ser alvos apropriados para ações de ansiolíticos (NEUMEISTER; DAHER; CHARNEY, 2005).

Nesse contexto, o desenvolvimento de drogas também visa gerar novos agentes farmacológicos com ação em neurotransmissores e neuropeptídeos, incluindo a sua recaptação e metabolismo (GILHOTRA; DHINGRA, 2010).

A quinta edição do Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (DSM-V, do inglês, *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*) demonstrou um aumento constante no número de categorias de ansiedade quando comparado à edições anteriores e outros grandes sistemas de classificação para transtornos mentais. Por exemplo, o DSM-V inclui 12 transtornos de ansiedade, enquanto o DSM-II (American Psychiatric Association 1968) incluiu apenas 3 categorias. Este aumento corrobora com o fato de que houve uma expansão do conhecimento acumulado sobre a natureza desta psicopatologia e da sua classificação (STEIN; HOLLANDER; ROTHBAUM, 2011). Segundo os mesmos autores, a ansiedade pode ser classificada clinicamente em síndrome do pânico, síndrome do pânico com agorafobia, fobia social, fobia específica, transtorno de ansiedade generalizada, transtorno obsessivo-compulsivo (retirado dessa categoria no DSM-V), transtorno de estresse pós-traumático.

2.3.1. Modulações neuroquímicas da ansiedade

Estudos prévios têm demonstrado que diversos sistemas neurotransmissores estão envolvidos com o desenvolvimento da ansiedade. A seguir, estes sistemas serão revisados.

Existem duas linhas de evidência distintas sobre a modulação colinérgica do estado ansioso. A entrada colinérgica no hipocampo é reforçada em resposta a estímulos ansiogênicos e estressores, nos quais os receptores muscarínicos do tipo M1 medeiam a indução de estados de ansiedade através das vias noradrenérgicas. Por outro lado, a nicotina facilita a neurotransmissão GABAérgica e induz um estado ansiolítico, que também é observado após o aumento dos níveis de acetilcolina subsequente à administração da fisostigmina, uma droga anticolinesterásica, no hipocampo dorsal ou ventral. Além disso os receptores nicotínicos da acetilcolina possuem importância fundamental para o comportamento social (SALAS *et al.*, 2003, 2013).

O sistema de neurotransmissão mediado pela adenosina também está envolvido com a ansiedade. A adenosina é formada a partir da hidrólise da 5-adenosina monofosfato, posteriormente, convertida em inosina e é então armazenada como adenosina-5'-trifosfato (ATP), (LATINI; PEDATA, 2001). Através de seus receptores A₁ e A_{2A}, a adenosina exerce papel ansiolítico a partir da sua influência facilitadora na liberação do ácido γ -aminobutírico (GABA) no septo e no hipocampo (POELCHEN *et al.*, 2001)

A arginina vasopressina (AVP), um nonapeptídeo que regula o sistema hipotálamo-pituitária-adrenal (eixo HPA) aumentando os efeitos do Fator Liberador de Corticotrofinas (CRF) sobre a liberação do hormônio adrenocorticotrópico (ACTH), exibe seus efeitos através de receptores acoplados a proteínas G (receptores V1A e V1B) e parece estar envolvida com um estado ansiogênico, visto que o fármaco SSR149415, um antagonista não-peptídico seletivo para os receptores V1B (ativo por via oral), produziu efeito ansiolítico (GRIEBEL *et al.*, 2002).

O peptídeo natriurético atrial (ANP) é produzido pelo coração e liberado na corrente sanguínea. A administração intracerebroventricular desse peptídeo desencadeia a atividade ansiolítica nos testes do campo aberto (CA), interação social e labirinto em cruz elevado (LCE) (STRÖHLE *et al.*, 1997). A administração central e periférica da atriopeptina II, um aminoácido residual do ANP, produziu o mesmo efeito no teste de LCE (STRÖHLE *et al.*, 2001).

O sistema dos canabinoides está claramente envolvido com a ansiedade. Este sistema suprime o fluxo de glutamato, norepinefrina (NE) e dopamina (DA) no hipocampo e no córtex cerebral que interferem na transmissão GABAérgica na amígdala, hipocampo e córtex frontal (PISTIS *et al.*, 2002). Devido ao padrão complexo de influência de canabinoides na liberação de neurotransmissores, tanto o perfil ansiolítico quanto o ansiogênico foram observados (MARTIN *et al.*, 2002).

A colecistocinina (CCK) é um dos neuropeptídeos cerebrais mais abundantes. As fibras CCK-imunorreativas e os receptores CCK (2) estão presentes em grandes quantidades na região cinzenta periaquedutal (PAG), que medeia a ansiedade. A expressão neuronal do receptor CCK-2 resulta na manifestação de comportamentos ansiogênicos, atenuados pelo diazepam (CHEN *et al.*, 2006).

O CRF medeia respostas endócrinas, autonômicas e comportamentais ao estresse (HENRY, 2006). A administração de oligodesoxinucleotídeo, uma espécie de bloqueador de transcrição gênica correspondente à região de início da codificação do RNAm de CRF em ratos estressados, diminuiu a biossíntese de CRF e reduziu o comportamento relacionado à ansiedade (SKUTELLA *et al.*, 1998).

O GABA é o maior sistema neurotransmissor inibitório do sistema nervoso central (SNC). A presença de GABA no tecido neural tende a hiperpolarizar os neurônios. Esta hiperpolarização ocorre quando o neurotransmissor GABA se liga aos receptores GABA-A presentes nos neurônios. Como consequência disto, ocorre o aumento do influxo dos íons de cloreto, carregados negativamente, para o interior do corpo celular do neurônio. Essa negatividade eletroquímica inibe o neurônio e diminui a probabilidade de disparar outros impulsos elétricos. À medida que os níveis de GABA e a atividade GABA aumentam, o disparo e atividade neuronal diminuem (SCHWARTZ *et al.*, 2005). Fisiologicamente, o GABA é sedativo e relaxante muscular. Existem evidências pré-clínicas e clínicas da desregulação do tônus GABAérgico nos transtornos de ansiedade. A tiagabina, um inibidor seletivo da recaptação de GABA exerce efeito ansiolítico através do bloqueio do transportador GAT 1, facilitando assim a neurotransmissão GABAérgica (DUNLOP *et al.*, 2007). Algumas plantas medicinais com efeito ansiolítico, como é o caso das raízes de valeriana, contêm quantidades importantes de GABA e possuem atividades GABAérgicas (GILHOTRA; DHINGRA, 2010).

A galanina endógena suprime neurônios noradrenérgicos, serotoninérgicos e dopaminérgicos (YOSHITAKE *et al.*, 2004), produzindo efeito ansiolítico na amígdala em resposta a condições estressoras (STRAWN; GERACIOTI, 2008). No entanto, a

galanina exógena produziu efeitos variáveis nos estados de ansiedade. A infusão de galanina na região medial caudal e dorsal do núcleo da rafe exibiu um efeito ansiolítico em ratos no LCE (SILOTE *et al.*, 2013).

Com relação ao glutamato, suas concentrações são demasiadamente altas após a exposição a estímulos aversivos e estresse (TIMMERMAN *et al.*, 1999). Antagonistas do glutamato exibiram um perfil ansiolítico no teste do LCE e atenuaram respostas comportamentais e celulares em ratos expostos à predadores vivos (AGUIAR; GUIMARÃES, 2009; MOLCHANOV; GUIMARÃES, 2002). Semelhantemente, o peptídeo-1 tipo glucagon é amplamente presente nos neurônios do tronco encefálico, que inervam *locus ceruleus*, hipocampo e amígdala. A injeção desse peptídeo na amígdala produziu efeito ansiogênico (GULEC; ISBIL-BUYUKCOSKUN; KAHVECI, 2010).

O receptor do hormônio concentrador de melanina (MCH) MCH 1 também está envolvido com a regulação das respostas de emoção e estresse. O bloqueio dos receptores MCH 1 resulta em efeitos antidepressivos e ansiolíticos. Os efeitos dos antagonistas dos receptores MCH 1 em modelos animais, juntamente com o seu rápido início de efeito e a ausência de efeitos adversos sobre o SNC, tornam este sistema de suma importância na investigação de possíveis novos tratamentos para depressão e distúrbios de ansiedade (SHIMAZAKI; YOSHIMIZU; CHAKI, 2006). Já a melatonina controla o sono e o ritmo, que geralmente são desregulados pela ansiedade. Em estudos anteriores, a melatonina produziu um importante efeito ansiolítico e analgésico (MADSEN *et al.*, 2017).

A maioria dos neurônios noradrenérgicos é encontrada no *locus ceruleus* e a neurotransmissão noradrenérgica alterada está relacionada aos distúrbios de ansiedade, sendo que a estimulação prolongada do *locus ceruleus* resulta na manifestação dos sintomas de ansiedade. A liberação de NE induzida por estresse facilita uma série de respostas comportamentais semelhantes à ansiedade, incluindo redução da exploração do braço aberto no LCE e redução do comportamento de interação social (MORILAK *et al.*, 2005). Os ratos deficientes em transportadores de NE aumentaram, conseqüentemente, as catecolaminas circulantes, bem como a frequência cardíaca e a pressão arterial (KELLER *et al.*, 2006). Os bloqueadores de receptores β -adrenérgicos são utilizados clinicamente na terapêutica atual para o tratamento da ansiedade de desempenho (ERNST *et al.*, 2016).

Quanto ao neuropeptídeo Y (NPY), a ativação dos receptores Y1 e Y5 na amígdala basolateral produziu efeito ansiolítico dose-dependente, que foi revertida pelos antagonistas dos receptores α 2-adrenérgicos. Além disso, camundongos *knockout* para o

NPY demonstraram exacerbação do comportamento relacionado à ansiedade (TASAN *et al.*, 2016).

O sistema de neuroesteroides também está relacionado com a ansiedade. Os neuroesteroides, são esteroides sintetizados a partir de colesterol em células gliais e neurônios e têm a capacidade de alterar a excitabilidade neuronal. Eles exercem efeito ansiolítico através dos receptores GABA-A (UMATHE *et al.*, 2009; VAN BROEKHOVEN; VERKES, 2003). Derivados de desoxicorticosteroides como 3 α ,5 α -tetrahydroprogesterona (3 α ,5 α THP) e 3 α ,5 α -tetrahydrodesoxicorticosterona (3 α ,5 α THDOC) se ligam aos receptores GABA-A e aumentam o influxo de cloreto para interior dos neurônios, semelhantes aos benzodiazepínicos. Os neuroesteroides exibem um grande potencial como alvo terapêutico para o tratamento de transtornos de ansiedade, com eficácia melhorada e sem incidência de efeitos colaterais e cognitivos (VISSER, 2002).

Os neurônios serotoninérgicos estão envolvidos com a alteração do apetite, energia, sono, humor e função cognitiva na ansiedade. Seu papel nesta doença é evidenciado devido ao seu efeito modulador sobre o *locus ceruleus* e suas projeções para a amígdala, estrutura cerebral conclusivamente envolvida na ansiedade. O medo e o estresse ativam vias serotoninérgicas cerebrais (DUBOVSKY; THOMAS, 1995; LINLEY; OLUCHA-BORDONAU; VERTES, 2017).

Outro sistema envolvido nos distúrbios de ansiedade é o sistema das taquicininas. Estão presentes em todo o cérebro, medula espinhal e sistema nervoso periférico. Estudos pré-clínicos sugerem efeitos ansiolíticos para os antagonistas dos receptores NK1 (VASSOUT *et al.*, 2000). Além disso, a interrupção a atividade do receptor NK1 por técnicas *knockout* resulta em redução da ansiedade em resposta ao estresse (SANTARELLI *et al.*, 2001).

2.3.2. Modelos animais para avaliação da atividade ansiolítica

Os modelos animais de ansiedade foram desenvolvidos para dois propósitos principais: 1) Pesquisar compostos com potencial atividade ansiolítica e; 2) Estudar a neurobiologia da ansiedade. No entanto, um problema que ocorre com o uso de modelos animais para estudar ansiedade é a diversidade destes transtornos nos seres humanos. Considera-se que fatores genéticos e ambientais desempenham um papel importante na

fisiopatologia da maioria dos transtornos de ansiedade (STEIN; HOLLANDER; ROTHBAUM, 2011).

A ansiedade não é fácil de ser descrita e correlacionada com um determinado comportamento humano observável; prova disto são as muitas mudanças correntes no tratamento da ansiedade e nas classificações psiquiátricas ao longo de sua história, incluindo a mudança mais recente do DSM-IV para o DSM-V em 2013 que substituiu alguns dos "antigos" transtornos de ansiedade. No entanto, o repertório comportamental e as expressões faciais dos roedores são ainda mais limitados e, sendo assim, justificam o uso de testes comportamentais. Qualquer leitura comportamental resultante de uma tarefa desafiadora para o animal é, contudo, susceptível de envolver simultaneamente uma infinidade de processos cerebrais (HARRO, 2017). Portanto, o desafio é ainda maior para os pesquisadores que trabalham com pesquisas pré-clínicas nessa área, pois é necessário correlacionar a sintomatologia complexa e mal compreendida em seres humanos a comportamentos observáveis em animais (ROBERTSON *et al.*, 2016).

As espécies de animais mais utilizadas na pesquisa pré-clínica envolvendo a ansiedade são o camundongo (*Mus musculus*) e o rato (*Rattus norvegicus*). Tradicionalmente, os ratos foram as espécies de escolha para a farmacologia comportamental devido às considerações práticas de seu tamanho e facilidade à intervenção cirúrgica, bem como capacidade cognitiva e desempenho superiores em tarefas operantes e cognitivas. Muitos paradigmas comportamentais comumente usados foram inicialmente desenvolvidos e validados como modelos de atividade ansiolítica em ratos antes da adaptação com outras espécies (CRYAN; HOLMES, 2005).

2.3.2.1. Teste do labirinto em cruz elevado (LCE)

Desenvolvido por Handley e Mithani (1984) e posteriormente validado farmacológica, fisiológica e comportamentalmente por Pellow e colaboradores (1985) consiste num modelo que explora o conflito entre a tendência natural de roedores de explorar ambientes novos e a aversão natural que estes animais apresentam a altura e espaços abertos. Um aumento seletivo nos parâmetros correspondentes aos braços abertos revela um efeito ansiolítico.

O equipamento é construído em madeira e pintado com tinta óleo cor preta, elevado 50 cm do piso, apresentando dois braços abertos e opostos medindo 50 x 10 cm cada, e cruzados perpendicularmente por outros dois braços do mesmo tamanho, porém

fechados nas suas três faces externas com paredes de 40 cm de altura (figura 5). A iluminação da sala de 1,5 m x 1,5 m é feita por uma lâmpada vermelha de 40 watts colocada a 120 cm acima do labirinto. Os ratos são colocados individualmente na área central do labirinto e observados por 5 minutos. Durante esse tempo o número e o tempo de entradas nos braços abertos e fechados são registrados. É considerada uma entrada a partir do momento em que o animal coloca as quatro patas em um dos braços do labirinto. A partir dessas variáveis, porcentagem de tempo no braço aberto é calculada (VILLAS-BOAS; LACERDA, 2011).



Figura 5. Labirinto em Cruz Elevado. FONTE: Adaptado de: BARETTA; ANDREATINI, 2012.

2.3.2.2. Teste do campo aberto (CA)

O CA é uma arena circular ou retangular bem iluminada, maior que a gaiola do animal e corresponde a um ambiente novo, estranho e levemente aversivo (DENENBERG, 1969). A locomoção é mensurada em termos de número de quadrantes cruzados pelos animais durante o teste, sendo que a invasão aos quadrados centrais, bem como o tempo de *freezing*, possuem grande validade preditiva para efeito ansiolítico de determinado composto. O princípio do teste do CA tem sido usado para avaliar a ansiedade em uma ampla variedade de espécies animais como, por exemplo, ratos, camundongos, hamsters, furões, raposas, cães, gado, ovelhas, porcos, codornas, entre outros (GOSLING, 2001). Contudo, o CA nem sempre foi destinado ao estudo da ansiedade em termos traduzíveis para a psiquiatria contemporânea. Na verdade, o banco de dados PubMed revela poucas referências à pesquisa com o CA explicitamente relacionada à ansiedade até os anos 90 (HARRO, 2017).

O aparato é construído com piso de madeira e paredes de aço escovado (ou, alternativamente, de acrílico ou PVC) com 50 cm de altura delimitando uma área circular de 50 cm de diâmetro sendo o assoalho pintado de branco, subdividido com linhas pretas traçadas através de dois círculos concêntricos com várias linhas radiais formando figuras semelhante a trapézios com aproximadamente 100 cm² de área (figura 6). A um metro acima do assoalho há quatro lâmpadas de 100 watts cada (VILLAS-BOAS; LACERDA, 2011). Cada animal é colocado no centro da arena e o seu comportamento quantificado durante 5 minutos. Os parâmetros registrados são: 1) Os números de “trapézios” invadidos (ambulação); 2) *Rearing* (número de vezes que o animal se mantém nas patas traseiras); 3) *Freezing* (tempo parado); 4) *Grooming* (tempo que o animal executa comportamento de auto-limpeza) e; 5) Tempo de latência para o animal abandonar o centro da arena. A tendência natural dos animais em um ambiente novo é a de explorá-lo.



Figura 6. Imagem ilustrativa da arena utilizada no teste do campo aberto. FONTE: SCIENLABOR, 2013.

2.3.2.3. Teste de esconder esferas (*Marble-Burying Test*)

Nos últimos anos, vários pesquisadores utilizaram o ensaio de esconder esferas como uma ferramenta para avaliar os comportamentos similares à ansiedade em camundongos (HARRO, 2017). Ensaios farmacológicos iniciais incentivaram o

estabelecimento do teste como um modelo potencial de ansiedade devido à sua sensibilidade a ansiolíticos como o diazepam (BROEKKAMP *et al.*, 1986).

No entanto, o teste de esconder as esferas demonstra estar mais relacionado com o transtorno obsessivo compulsivo, um tipo específico de ansiedade, do que com ansiedade generalizada, visto que drogas como a clomipramina e os inibidores seletivos da serotonina, efetivos na clínica para este distúrbio, diminuem o número de esferas escondidas pelos animais (ICHIMARU; EGAWA; SAWA, 1995). Outro aspecto que evidencia que o procedimento está relacionado a esse transtorno é a habituação. Os animais submetidos a esse procedimento experimental não apresentam comportamento de habituação quando expostos às esferas de vidro, ou seja, continuam a enterrá-las quando expostos novamente em dias consecutivos. O comportamento de esconder, neste caso, está intimamente relacionado às compulsões (NJUNG'E; HANDLEY, 1991), diferente de modelos clássicos de transtorno de ansiedade como o LCE, no qual os animais expostos por uma segunda vez demonstram comportamentos de habituação. Apesar disso, pesquisas prévias demonstraram que drogas ansiolíticas reduzem o número de esferas escondidas (TREIT; PINEL; FIBIGER, 1981).

Para se efetuar o teste de esconder esferas os animais são colocados em caixas de acrílico transparente com maravalha e 20 bolinhas de vidro distribuídas nas laterais da caixa, equidistantes entre si e na superfície da maravalha (figura 7). O teste dura 30 minutos e o número de bolinhas de vidro escondidas pelos animais durante a vigência do teste é registrado (BROEKKAMP *et al.*, 1986; NJUNG'E; HANDLEY, 1991). Drogas ansiolíticas reduzem ou suprimem o comportamento de esconder as esferas (TREIT *et al.*, 1981).

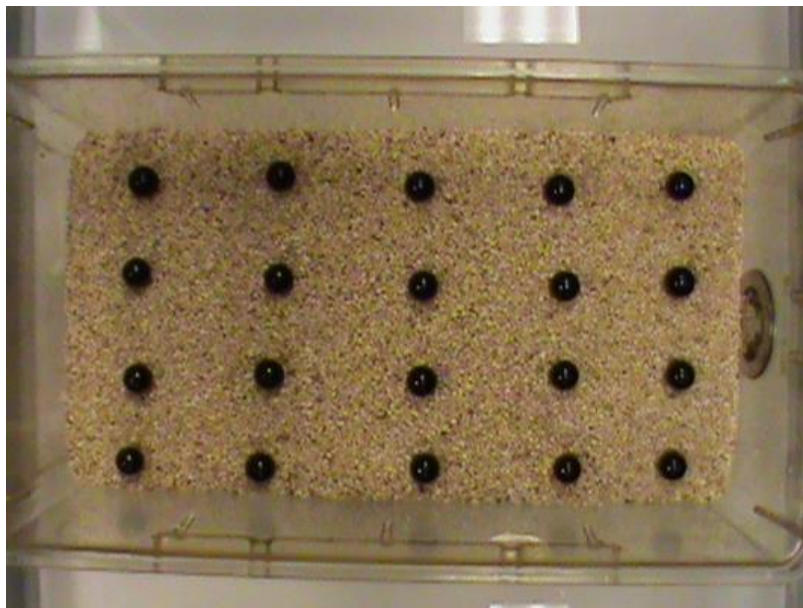


Figura 7. Imagem ilustrativa do aparato utilizado no teste de esconder esferas. FONTE: (MOY; NIKOLOVA; RIDDICK, 2018)

2.3.3. Tratamentos atuais da ansiedade

Durante milênios, os seres humanos buscaram agentes químicos que modificassem os efeitos do estresse e sentimentos de desconforto, tensão, ansiedade e disforia; o mais antigo deles é o álcool. No século 19, os alcaloides, os sais de brometo e o hidrato de cloral foram utilizados como hipnóticos sedativos. Um grande avanço veio com a introdução dos barbitúricos na prática clínica no início do século 20. Estas drogas provocam seus efeitos ao ativarem os receptores GABA-A no SNC, facilitando a abertura dos canais de cloreto e aumentando, conseqüentemente, seu influxo para o interior dos neurônios. Os modelos animais, especialmente os paradigmas baseados em cães, foram particularmente úteis na identificação das propriedades sedativas e anticonvulsivantes de tais drogas. Enquanto os barbitúricos eram populares como tranquilizantes, seus principais efeitos adversos incluíam alterações comportamentais, sedação, tolerância e dependência. Além disso, possui um baixo índice terapêutico, ou seja, a dose terapêutica se aproxima perigosamente da dose tóxica, o que levou a indústria farmacêutica a procurar alternativas mais seguras (LÓPEZ-MUÑOZ; UCHA-UDABE; ALAMO, 2005).

Foi nesse contexto que as drogas benzodiazepínicas foram desenvolvidas, revolucionando o tratamento dos distúrbios de ansiedade. O primeiro benzodiazepínico clinicamente utilizado foi o clordiazepóxido, sintetizado por Sternbach na década de 1950 na *Hoffman La Roche Pharmaceutical Company* (STERNBACH, 1979). A nível

molecular, os benzodiazepínicos provocam seus efeitos por serem moduladores alostéricos positivos dos receptores GABA-A no SNC e, portanto, apenas induzem efeitos em sinapses onde o GABA está presente. Estudos comportamentais indicaram que o clordiazepóxido possui perfil farmacológico distinto dos barbitúricos e outros medicamentos psicoativos como, por exemplo, a clorpromazina, um antipsicótico, e a reserpina, um anti-hipertensivo (HANSON, 2005; RANDALL, 1960).

Apesar das vantagens dos benzodiazepínicos em relação aos barbitúricos, principalmente quanto à sua segurança, seu uso a longo prazo provoca dependência, tolerância e efeitos adversos cognitivos e comportamentais, dificultando o tratamento. Isso mais uma vez levou a um grande esforço dos pesquisadores em busca de novas terapias tendo como principal alvo o sistema GABAérgico, o que permanece até os dias atuais (CRYAN; SWEENEY, 2011).

O sistema serotoninérgico desempenha um papel importante na ansiedade e, neste aspecto, este sistema tem sido investigado há mais de 50 anos desde que Aprison e Ferster evidenciaram que o 5-hidroxitriptofano, precursor da 5-hidroxitriptamina (serotonina) (5-HT), aumentou as respostas de pombos submetidos a um modelo de conflito operante (APRISON; FERSTER, 1961). Ainda assim, a visão sobre o envolvimento do sistema serotoninérgico com a ansiedade se deu a partir da observação da atividade dos antagonistas da 5-HT em paradigmas de conflito operante em ratos (ROBICHAUD; SLEDGE, 1989), bem como de uma associação entre a redução do metabolismo da 5-HT e os efeitos ansiolíticos dos benzodiazepínicos (GOLDBERGE; MEAIAN; EFRON, 1967). Estas pesquisas culminaram no desenvolvimento de terapias baseadas na 5-HT para transtornos de ansiedade ao longo da década de 1970 e início da década de 1980 (TAYLOR; MOON, 1991), sendo a principal entre elas os medicamentos da classe das azapironas, da qual a buspirona foi a mais bem-sucedida. A buspirona atua como um agonista parcial do receptor 5-HT_{1A}, e seu uso permitiu o desenvolvimento de novos fármacos ansiolíticos que não possuem os mesmos efeitos adversos dos medicamentos que atuam no sistema GABAérgico. Além disso, abriu a possibilidade de que a modulação do sistema serotoninérgico possa ter benefício clínico nos transtornos de ansiedade. Hoje, a buspirona possui uso limitado, embora geralmente seja bem tolerada e com poucos efeitos adversos, sua eficácia é menor e o início da sua ação é mais lento do que as drogas benzodiazepínicas (CRYAN; SWEENEY, 2011).

A constatação clínica de que a ansiedade e a depressão são comórbidas e as observações sobre a eficácia de antidepressivos tricíclicos (ADT) na ansiedade, levou à

conclusão de que os inibidores seletivos da recaptação de serotonina (ISRSs) são eficazes no tratamento de transtornos de ansiedade (RICKELS *et al.*, 1974, 1993). Na verdade, hoje os ISRSs são considerados a terapia de primeira escolha para muitos transtornos de ansiedade (HOFFMAN; MATHEW, 2008). O desenvolvimento dos ISRSs para depressão e, subsequentemente, para ansiedade foi impulsionado por estudos mecanicistas focados na modulação da neurotransmissão monoaminérgica *in vitro* e *in vivo*, sendo que inicialmente os modelos comportamentais não foram muito utilizados (WONG; PERRY; BYMASTE, 2005). Este é um exemplo claro de que os modelos animais tiveram pouco a ver com a introdução clínica desses tratamentos para a ansiedade. De fato, poucos efeitos positivos dos ISRSs foram observados a partir dos modelos animais tradicionais de ansiedade, contrariamente, efeitos ansiogênicos frequentemente são observados (BORSINI; PODHORNA; MARAZZITI, 2002; SÁNCHEZ; MEIER, 1997), provavelmente porque nestes estudos os ISRSs são administrados agudamente. Nesse sentido, deve-se ter em mente que um período transitório de aumento da ansiedade é, geralmente, relatado por pacientes que iniciam a terapia com os ISRSs (BALDWIN; AJEL; GARNER, 2010; VASWANI; LINDA; RAMESH, 2003).

Ultimamente, tem ocorrido uma crescente discussão focada na questão de que a pesquisa para o desenvolvimento de novas drogas para ansiedade e a depressão devem ser isoladas (SHORTER; TYRER, 2003). Além disso, dado o sucesso relativo dos ISRSs, ficou perceptível que muitas indústrias farmacêuticas são compelidas a desenvolver uma abordagem do tipo "*uma pílula serve para tudo*" com relação aos distúrbios do humor. Recentemente, esforços têm sido empregados nas pesquisas com os neuropeptídeos como, por exemplo, os antagonistas dos receptores do CRF, os antagonistas de receptores NK1 e os antagonistas da melanocortina, sendo que ainda não atingiram os objetivos propostos inicialmente (EBNER; SARTORI; SINGEWALD, 2009; SHIMAZAKI; YOSHIMIZU; CHAKI, 2006; TAKAHASHI, 2001). Outras investigações descobriram efeitos promissores de drogas que atuam sobre os receptores acoplados à proteína G de neurotransmissores não-monoaminérgicos, GABA e glutamato (CHOJNACKA-WÓJCIK; KŁODZINSKA; PILC, 2001; CRYAN; KAUPMANN, 2005).

Embora existam fatores sobrepostos que contribuem para a história natural de ansiedade e depressão, a manifestação sintomática e o tratamento de cada doença podem ser muito diferentes. Os benzodiazepínicos, por exemplo, possuem eficácia limitada na depressão, porém, ainda representam uma intervenção muito eficaz nos transtornos de

ansiedade. Já os antidepressivos ISRSs são úteis em ambos os distúrbios. Assim, a compreensão da neurobiologia de ambos os distúrbios é crucial para a elaboração de novas intervenções farmacológicas (CRYAN; SWEENEY, 2011).

2.4. Depressão

Atualmente, sabe-se que o MDD é desencadeado devido à disfunção de muitos neurotransmissores ou sistemas metabólicos cerebrais. Ambos os estudos básicos e clínicos demonstraram que os sistemas neurotransmissores da NE e 5-HT estão claramente envolvidos na depressão (FERRARI; VILLA, 2016).

A depressão está relacionada com emoções que envolvem a tristeza e o luto, que normalmente permeiam a vida do ser humano. No entanto, quando causas externas dessas emoções se dissipam e são desproporcionais à sua natureza, há necessidade de investigação e tratamento. Os estados severos clássicos de depressão, muitas vezes, não têm causa precipitante externa. No entanto, é difícil estabelecer distinções claras entre a depressão e as manifestações de humor e comportamento em pessoas sem eventos psicossociais como agentes indutores do distúrbio (WAKEFIELD *et al.*, 2007). O diagnóstico do MDD requer mudança do humor caracterizado por tristeza ou irritabilidade e acompanhado de uma variedade de alterações psicofisiológicas como: 1) Distúrbios do sono, apetite ou desejo sexual; 2) Prisão de ventre; 3) Anedonia, ou seja, a incapacidade de sentir prazer no trabalho, com amigos ou situações normalmente prazerosas; 4) Choro e melancolia; 5) Pensamentos suicidas e; 6) Lentificação do discurso e da capacidade de iniciativa. Essas mudanças devem durar pelo menos 2 semanas e interferir consideravelmente no trabalho e nas relações familiares e sociais (KESSLER *et al.*, 2003).

Uma pequena porcentagem de pacientes com diagnóstico provável de MDD teve ou terá episódios maníacos que consistem em hiperatividade, euforia e um aumento na busca por prazer. Embora alguns mecanismos patogênicos se sobreponham nesses casos, um histórico de mania, juntamente com sinais e sintomas do MDD, define uma doença distinta denominada de transtorno bipolar (BELMAKER, 2004).

A depressão é um distúrbio mental heterogêneo com curso altamente variável, resposta inconsistente ao tratamento e nenhum mecanismo sólido bem estabelecido (BELMAKER; AGAM, 2008).

2.4.1. Teorias neurobiológicas da depressão

As principais teorias que explicam o MDD e que serão revisadas nesta seção são:

1) O papel das monoaminas; 2) O eixo HPA e o envolvimento do estresse e do sistema neuroendócrino; 3) O processo inflamatório; 4) O envolvimento das neurotrofinas e; 5) O papel das mitocôndrias.

2.4.1.1. O papel das monoaminas na depressão

A neuroquímica cerebral foi um dos primeiros aspectos estudados para explicar as bases biológicas da depressão. A hipótese monoaminérgica original é derivada do achado clínico “farmacocêntrico” de que a depleção de monoamina pelo anti-hipertensivo reserpina causou depressão em pacientes que não sofriam da doença antes da terapia com esta droga. Esta hipótese foi apoiada pela descoberta de que os antidepressivos protótipos (os ADTs) e os inibidores da monoamina oxidase (MAOi) causam o aumento de curto prazo das concentrações sinápticas das monoaminas, revertendo, conseqüentemente, os sinais e sintomas da depressão. Os achados subseqüentes demonstraram concentrações reduzidas dos metabólitos das monoaminas no líquido cefalorraquidiano (LCR), corroborando com a teoria de que não apenas a deficiência de NE e 5-HT, mas também de DA estão envolvidas com o desenvolvimento da depressão (CLEARE, 2004).

Os estudos com os metabólitos da NE e 5-HT no plasma, urina e LCR, bem como estudos *post mortem* com cérebro de pacientes deprimidos, ainda não identificaram definitivamente essa deficiência e, ainda assim, a hipótese monoaminérgica continua a impulsionar as pesquisas atualmente. Por exemplo, a descoberta da isoforma da enzima triptofano hidroxilase (TPH, do inglês *tryptophan hydroxylase*) específica do cérebro (TPH-2) por Zhang e colaboradores (2005) poderia explicar por que os estudos *post mortem* anteriores sobre a atividade enzimática total não mostraram diferenças na atividade da TPH de pacientes com depressão e controles, ou seja, por este motivo os dados prévios não foram esclarecedores. A TPH catalisa o passo limitante na síntese de 5-HT e existem duas isoformas da enzima codificadas pelos genes TPH-1 e TPH-2 em seres humanos. A isoforma TPH-1 é expressa principalmente nas periferias do organismo, porém, está presente em pequenas concentrações no SNC, enquanto que a isoforma TPH-2 é expressa exclusivamente no SNC (WALTHER; BADER, 2003).

Um estudo de imagem através da tomografia por emissão de pósitrons (PET), utilizando marcador para a enzima monoamina oxidase (MAO) cerebral, exibiu um aumento de 30% do conteúdo da enzima em um subgrupo de pacientes deprimidos (MEYER *et al.*, 2000). Investigações neuroquímicas que medem as diferenças das concentrações de metabólitos da MAO entre a veia jugular interna e a artéria braquial demonstrou menor concentração de metabólitos de NE derivados do cérebro de pacientes deprimidos do que nos controles (LAMBERT *et al.*, 2000).

O neurocircuito funcional dos neurônios monoaminérgicos está esquematizado na figura 8. O papel das monoaminas na depressão foi investigado mais profundamente com o uso de paradigmas de depleção de NE e 5-HT em indivíduos normais e pacientes sob uso de medicamentos antidepressivos por Miller e colaboradores (MILLER *et al.*, 1996). Os resultados deste estudo demonstraram que, embora a depleção de NE e 5-HT não induza sintomas depressivos em indivíduos normais, os pacientes que obtiveram a remissão da doença após os tratamentos eram vulneráveis à recaída após a depleção dessas monoaminas. Resultados semelhantes foram demonstrados por Ruhé e colaboradores (2007) numa meta-análise que relatou que a depleção de monoamina estava correlacionada com a redução do humor tanto em pacientes com histórico familiar de MDD quanto em pacientes que entraram em remissão da doença e não estavam utilizando os antidepressivos. Todos esses dados indicam que a NE e 5-HT estão, de alguma forma, envolvidas na manutenção da resposta antidepressiva, mas não podem explicar por si só a fisiopatologia da depressão ou o mecanismo de ação dos antidepressivos. Um fato conclusivo quanto a isso é o tempo necessário para que o tratamento antidepressivo desenvolva a ação terapêutica demasiadamente longo (várias semanas), mesmo que os níveis de monoaminas sejam aumentados rapidamente (em poucos minutos) por esses medicamentos (FERRARI; VILLA, 2016).

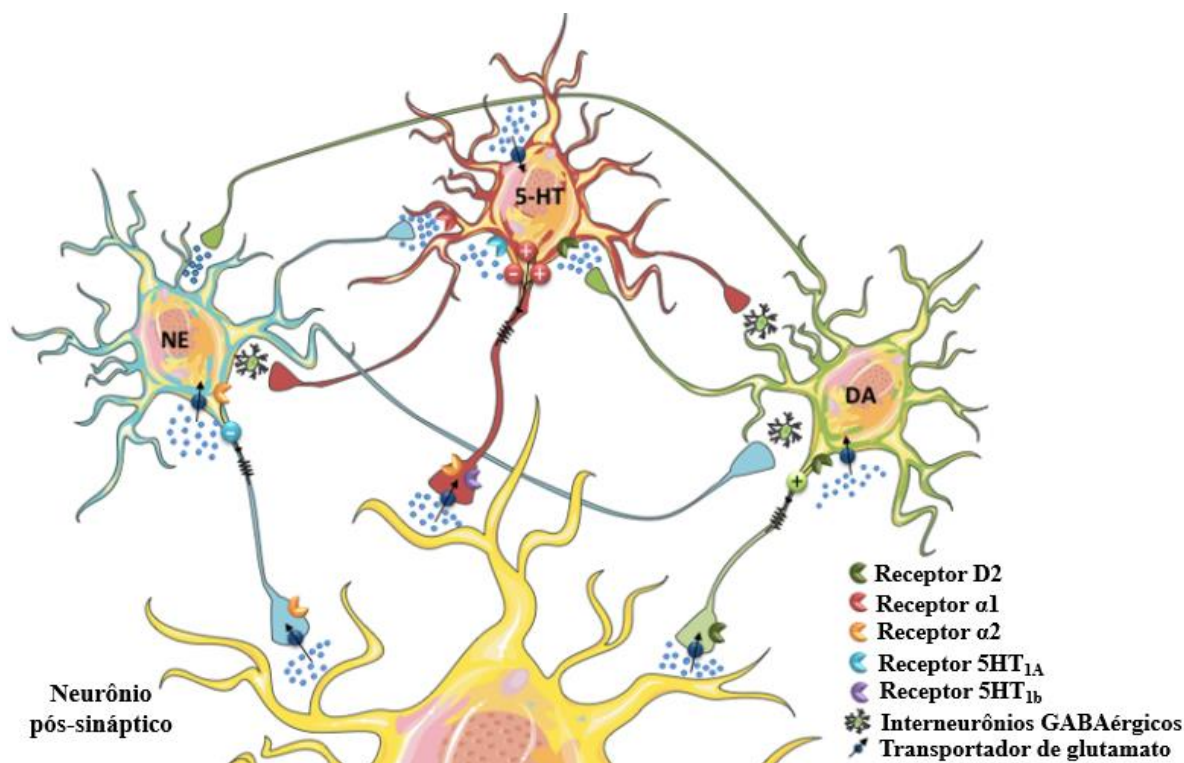


Figura 8. Circuito funcional de neurônios monoaminérgicos. FONTE: Adaptado de HAMON; BLIER, 2013.

A hipótese monoaminérgica original foi revisada para incluir alterações no processo de *downregulation* e dessensibilização de receptores de NE e 5-HT pré e pós-sinápticos. Nesse caso, a ativação contínua desses receptores durante a terapia levaria a adaptações no número (*downregulation*) e na capacidade de resposta dos receptores (dessensibilização), contribuindo para o atraso da ação terapêutica dos antidepressivos. Em estudos iniciais, os tratamentos antidepressivos de longo prazo demonstraram reduzir a densidade dos receptores de NE e 5-HT no SNC. Fato que comprova isto, é que a administração a longo prazo, mas não a curto prazo, de muitos tipos de antidepressivos diminui os sítios de ligação para o ligante nos receptores β -adrenérgicos (β AR), não apenas em regiões do sistema límbico, como o hipocampo, mas também no córtex cerebral (BANERJEE *et al.*, 1977). A capacidade dos β ARs de estimular a síntese de adenosina monofosfato cíclica (AMPC) é semelhantemente diminuída nessas regiões por tratamentos antidepressivos de longo prazo (DUMAN; HENINGER; NESTLER, 1997).

Os receptores α 2-adrenérgicos, que geralmente são pré-sinápticos, modulam a liberação de NE por *feedback* negativo. A sensibilidade aumentada desse receptor foi descrita em pacientes com depressão (ORDWAY *et al.*, 2003), o que provoca a redução da liberação de NE.

Uma hipótese de sensibilização do receptor 5-HT_{1A} também foi descrita por Blier e De Montigny. Esta hipótese afirma que os tratamentos antidepressivos a longo prazo aumentam a função dos receptores 5-HT_{1A} pós-sinápticos no hipocampo. Dependendo da droga de escolha para o tratamento, eles propuseram que essa sensibilização pode ocorrer devido à sensibilidade aumentada dos receptores pós-sinápticos 5-HT_{1A} ou pela dessensibilização de auto-receptores de 5-HT no SNC. No entanto, há um problema com esta hipótese, visto que os agonistas do receptor de 5-HT_{1A} de ação direta não possuem efeitos antidepressivos eficazes, e o aumento da neurotransmissão via receptor 5-HT_{1A} é necessário, porém, insuficiente para a eficácia da terapia antidepressiva (BLIER; DE MONTIGNY, 1994). Além disso, esses receptores foram melhor avaliados em pacientes depressivos através da injeção de agonistas específicos e mensuração das respostas neuroendócrinas específicas, como, por exemplo, a elevação do nível de prolactina (PITCHOT *et al.*, 2005) ou por PET (SAVITZ; DREVETS, 2013). Os resultados sugerem que a sensibilidade desses receptores está reduzida em pacientes com depressão.

Os receptores pré-sinápticos 5-HT_{1B} regulam a liberação de 5-HT através de *feedback* negativo. Estudos *post mortem* mostram que os níveis de p11, uma proteína que auxilia na eficiência da sinalização via receptor 5-HT_{1B}, estão significativamente reduzidos no cérebro de pacientes deprimidos (SVENNINGSSON *et al.*, 2006).

Quanto aos subtipos dos receptores 5-HT, vale ressaltar o envolvimento dos receptores 5-HT_{2A} com os efeitos antidepressivos de algumas drogas. Estudos que dão suporte a essa teoria evidenciaram que alucinógenos como a psilocibina, um agonista de receptores 5-HT, causam efeitos antidepressivos em pacientes diagnosticados com depressão refratária ao tratamento (CARHART-HARRIS *et al.*, 2016). Os resultados demonstram que a magnitude e a persistência dos efeitos antidepressivos estão alinhados com os efeitos da psilocibina observados anteriormente em distúrbios psiquiátricos crônicos (FERRARI; VILLA, 2016).

Geralmente, pode-se dizer que as *downregulations*/dessensibilizações observadas indicam a ativação prolongada dos receptores secundária às elevações contínuas nos níveis de monoamina após tratamentos antidepressivos a longo prazo (HAMON; BLIER, 2013). O conteúdo tecidual desses receptores diminui, mas não é completamente eliminado, possibilitando que um número suficiente de receptores permaneça para responder aos níveis elevados de NE e 5-HT. Portanto, os tratamentos antidepressivos de longo prazo podem produzir a ativação prolongada das cascatas de transdução de sinal

intracelular; tais fatores intracelulares podem representar possíveis alvos comuns para muitos tipos distintos de antidepressivos (MORETTI; GORINI; VILLA, 2003).

Estudos sobre os sistemas dos segundo mensageiros fosfatidilinositol (PI) e AMPc demonstraram uma grande heterogeneidade de alterações moleculares em relação ao tipo de transtorno depressivo considerado. No MDD a atividade da subunidade α de proteína G inibitória (Gai) está aumentada, porém, a subunidade α da proteína G estimuladora (Gas) manteve-se inalterada enquanto que a atividade da adenilil ciclase (AC) diminuiu em várias áreas corticais do cérebro, sugerindo um desequilíbrio entre as funções inibitórias e excitatórias (MORETTI; GORINI; VILLA, 2003; PEREZ *et al.*, 2001). Também foram encontrados níveis reduzidos de inositol em estudos *post mortem* de cérebros de pacientes que cometeram suicídio (SHIMON *et al.*, 1997) e no córtex frontal de pacientes deprimidos em estudos espectroscópicos de ressonância magnética (MRS) (COUPLAND *et al.*, 2005). Por outro lado, foram obtidos resultados conflitantes em pacientes com MDD tratados e não tratados. A concentração do fator de transcrição CREB (proteína de ligação responsiva ao AMPc) no córtex foi maior (DOWLATSHAHI *et al.*, 1998), mas a ligação ao AMPc foi menor, nos pacientes tratados com antidepressivos do que nos pacientes não tratados (LOWTHER *et al.*, 1997). Além disso, estudos demonstraram que o comportamento de ratos que superexpressam o CREB na região cerebral do *giro dentado* correlacionou-se com o de ratos tratados com antidepressivos, porém, o contrário ocorreu quando o CREB foi superexpresso no *núcleo accumbens* (BLENDY, 2006). Curiosamente, o CREB *upregula* a expressão do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), que também poderia estar envolvido na fisiopatologia da depressão.

Contrariamente à depressão, o transtorno bipolar (BD) está associado a: 1) Aumento da transdução do sinal via AMPc, devido aos níveis elevados da proteína Gas e estimulação da proteína quinase A (PKA) (FIELDS *et al.*, 1999) e; 2) Hiperatividade do sistema de fosfoinositol, demonstrado pelo aumento da atividade da proteína Gq (estimuladora da enzima fosfolipase C), da proteína quinase C (PKC) e sua associação com RACK1 (SOARES; MALLINGER, 1995).

Em resumo, o que sustenta a hipótese monoaminérgica da depressão são os mecanismos de ação moleculares induzidos pelos antidepressivos atualmente disponíveis. Entretanto, aproximadamente dois terços dos pacientes respondem clinicamente a esses agentes, enquanto um terço demonstra respostas idênticas ao placebo (MANN, 2005). Sendo assim, sugere-se veementemente que os mecanismos desencadeadores do MDD

não estão relacionados apenas com monoaminas, mas com outros fatores patogênicos que necessitam ser estudados (SHELTON, 2007).

2.4.1.2. O eixo HPA, estresse e o sistema neuroendócrino

Originalmente o estresse foi descrito como uma resposta não específica do organismo a qualquer demanda imposta sobre ele. Atualmente, é considerado um evento ou experiência que ameaça a capacidade de um indivíduo de lidar e se adaptar. Como resultado, o agente estressor provoca uma resposta ao estresse que envolve a liberação de hormônios e outros mediadores celulares que podem promover a adaptação quando a resposta é eficientemente ativada e/ou bloqueada, mas que também promove processos fisiopatológicos quando a resposta é excessiva ou está desregulada (FERRARI; VILLA, 2016).

O estresse é percebido pelo córtex cerebral, transmitido ao hipotálamo, levando à ativação do eixo HPA. A atividade deste eixo é regulada pelo CRF e AVP, secretados pelo hipotálamo, que por sua vez estimula a hipófise a secretar o ACTH que, finalmente, ativa a secreção de glicocorticoides (cortisol em humanos e corticosterona em roedores) do córtex da glândula adrenal. Os glicocorticoides então se ligam aos seus receptores localizados no eixo HPA, onde exercem controle de *feedback* sobre CRF, AVP e secreção de ACTH (VILLA; FERRARI; GORINI, 2012).

Os glicocorticoides não só controlam as funções periféricas, metabólicas e imunológicas, mas também possuem vários efeitos centrais, como por exemplo: 1) Regulação da sobrevivência neuronal; 2) Regulação da neurogênese; 3) Regulação do tamanho do hipocampo; 4) Formação de novas memórias e; 5) Regulação da avaliação emocional sobre determinados eventos (PARIANTE; LIGHTMAN, 2008). Diante disso, os glicocorticoides representam um ponto de convergência crucial entre o estresse e funcionamento do cérebro e, portanto, não é surpreendente que vários estudos observaram uma atividade aumentada do eixo HPA em pacientes deprimidos que exibiram: 1) Níveis aumentados de cortisol na saliva, plasma e urina; 2) Aumento do nível de CRF no LCR e nas regiões do sistema límbico e; 3) Aumento do tamanho (bem como da atividade) das glândulas pituitárias e adrenais (NEMEROFF; VALE, 2005). Esta hiperativação do eixo HPA provavelmente está relacionada com alterações no controle de *feedback* negativo via glicocorticóides endógenos (HERBERT *et al.*, 2006).

Carroll e colaboradores (2007) demonstraram que a resposta supressora do cortisol está ausente em cerca de metade dos pacientes com depressão severa tratados com dexametasona, um glicocorticoide sintético que foi utilizado para avaliar a sensibilidade do hipotálamo aos sinais de *feedback* para o bloqueio da liberação de CRF. Por outro lado, uma potente inibição do eixo HPA por *feedback* foi induzida mesmo em doses reduzidas de dexametasona administrada em indivíduos saudáveis, levando a níveis reduzidos de cortisol durante 24 horas. Curiosamente, as terapias antidepressivas bem-sucedidas estão associadas à resolução do comprometimento do *feedback* negativo induzido por glicocorticoides no eixo HPA (PARIANTE, 2006).

De qualquer maneira, apenas subgrupos de pacientes deprimidos mostram a ativação do eixo HPA, sugerindo que a interação com a predisposição genética e eventos adversos, particularmente no início da vida, levariam a fenótipos vulneráveis caracterizados por reatividade amplificada ao estresse (KENDLER; GARDNER; PRESCOTT, 2006).

2.4.1.3. Depressão e o processo inflamatório

Os primeiros trabalhos sobre inflamação e ativação de células monocíticas e linfócitos T correlacionados com a depressão foram publicados na década de 90. Mais recentemente, este ponto de vista foi retomado e os pacientes com MDD demonstraram evidências de inflamação, o que foi demonstrado pelo aumento nas concentrações de citocinas inflamatórias como, por exemplo, fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina-1 (IL-1) e IL-6 no sangue periférico e LCR destes pacientes (DOWLATI *et al.*, 2010). Além disso, estudos evidenciaram que as proteínas de fase aguda, quimiocinas e moléculas de adesão estavam aumentadas no sangue periférico de pacientes deprimidos (HOWREN; LAMKIN; SULS, 2009) e Miller e colaboradores (2009) observaram que a administração de citocinas (interferon alfa (IFN- α)) e de indutores da inflamação (lipopolisacarídeos (LPS) e vacina contra a febre tifoide) contribuíram para alterações comportamentais semelhantes às observadas em pacientes deprimidos. Interessantemente, Capuron e colaboradores (2009) compararam a síndrome depressiva induzida por citocinas com a depressão e os resultados demonstraram que apenas o retardo psicomotor e a anorexia eram mais frequentes e/ou graves em indivíduos tratados com citocinas.

Os mecanismos moleculares pelos quais as citocinas podem afetar o comportamento são múltiplos. Estudos demonstraram que estas moléculas podem influenciar o metabolismo de NE, 5-HT e DA e as funções neuroendócrinas, levando a um deslocamento na curva de cortisol e aumento das suas concentrações noturnas (IWATA; OTA; DUMAN, 2013; MILLER, 2010), sugerindo a existência de uma importante correlação entre a ativação do “inflamassoma” e o eixo HPA (figura 9). Pesquisas utilizando roedores também demonstraram redução significativa do BDNF e, conseqüentemente, da neurogênese causada pelo estresse induzido por citocinas da imunidade inata (KOO; DUMAN, 2008). Além disso, a administração de IFN- α e da vacina contra a febre tifoide para humanos podem alterar: 1) Os neurocircuitos relacionados ao humor, incluindo os gânglios basais e córtex cingulado dorsal anterior e; 2) Regiões cerebrais que controlam comportamentos relacionados à atividade motora, motivação, ansiedade e reações de alarme (BRYDON *et al.*, 2008).

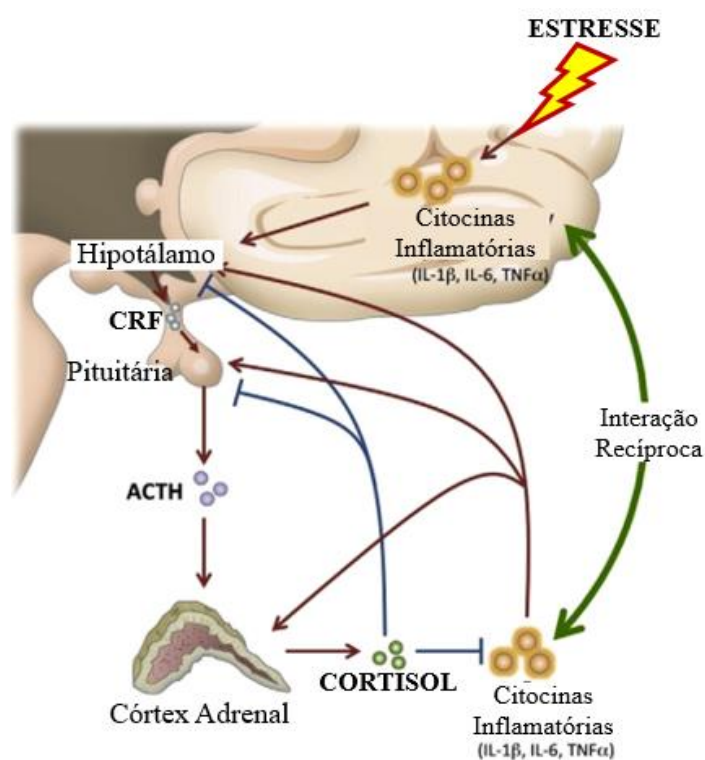


Figura 9. Citocinas pró-inflamatórias e o eixo HPA.

O CRF sintetizado e secretado pelo hipotálamo estimula a hipófise, que por sua vez libera o ACTH, levando a estimulação do córtex adrenal. O cortisol, um glicocorticoide, liberado fornece *feedback* negativo para o eixo HPA através do hipotálamo e pituitária, bem como do hipocampo. Os glicocorticoides também reprimem citocinas pró-inflamatórias em condições normais, embora, paradoxalmente, os níveis de citocinas permaneçam altos em pacientes deprimidos. A ativação das citocinas no eixo HPA, na presença de níveis elevados de glicocorticoides, pode resultar da interrupção dos mecanismos homeostáticos do eixo HPA; sendo assim, as citocinas inflamatórias ativam cada etapa do eixo HPA, incluindo o hipotálamo,

córtex hipofisário e adrenal. Isso ocorre ao mesmo tempo em que as citocinas desregulam o *feedback* negativo mediado pelo receptor de glicocorticoides. Neste modelo, as citocinas inflamatórias no cérebro são ativadas diretamente pelo estresse. Além disso, as citocinas pró-inflamatórias cerebrais podem afetar reciprocamente citoquinas periféricas, que podem ativar o eixo HPA e também influenciar outras regiões cerebrais através de vários mecanismos possíveis. O aumento das citocinas pró-inflamatórias no cérebro e na periferia provoca *feedback* negativo por parte dos glicocorticoides. Abreviações: ACTH, hormônio adrenocorticotrófico; CRF, fator liberador de corticotrofina. FONTE: Adaptado de IWATA; OTA; DUMAN, 2013.

Poucos estudos envolvendo o potencial da resposta imune adaptativa (células T) em desenvolver os distúrbios depressivos foram desenvolvidos, mesmo que tenha sido demonstrado que antidepressivos e estabilizadores do humor inibam as respostas imunes mediadas por células e induzem mudanças em linfócitos T auxiliares tipo 2 (Th2, do inglês *T helper*) (MAES, 2011; STEIN; MILLER; TRESTMAN, 1991). Os primeiros estudos relataram que a proliferação de células mononucleares em resposta a fitohemaglutinina e concanavalina A (mitógenos de células T) no sangue periférico está significativamente reduzida em pacientes com MDD grave (IRWIN; MILLER, 2007). Esses primeiros resultados foram confirmados através de abordagens meta-analíticas que chegaram ao consenso de que a redução estatisticamente significativa das respostas das células T estão presentes tanto em indivíduos que sofrem de estresse, como em pacientes com depressão (IRWIN; MILLER, 2007; SEPHTON *et al.*, 2009).

No entanto, os mecanismos das alterações das células T na síndrome depressiva ainda não foram completamente elucidados. Uma hipótese é que as células T de pacientes deprimidos sofrem uma maior taxa de apoptose quando comparado com pacientes controle, conforme demonstrado em estudos que utilizaram a técnica de citometria de fluxo (SZUSTER-CIESIELSKA *et al.*, 2008). Isso pode ocorrer devido a: 1) Depleção de triptofano, que é um estimulante proliferativo essencial para células T efectoras (BEISSERT; SCHWARZ; SCHWARZ, 2006); 2) Glicocorticoides, que induzem apoptose em células do sistema imunológico, especialmente em células que se desenvolvem no timo (MCEWEN *et al.*, 1997) e 3) Citocinas inflamatórias (LEE *et al.*, 2008).

Em conjunto, essas observações sugerem que o sistema imunológico pode desempenhar um papel crucial nos transtornos depressivos e o conhecimento sobre os tipos de células envolvidas e seus mecanismos moleculares pode ser útil para detectar biomarcadores no sangue periférico, que estão facilmente disponíveis e, acima de tudo,

seriam excelentes preditores dos resultados terapêuticos utilizados no controle da doença (FIŠAR; RABOCH, 2008).

2.4.1.4. As neurotrofinas e a depressão: Alterações da neuroplasticidade e correlação com as outras hipóteses etiopatológicas

Desde Cajal, médico e histologista espanhol considerado o "pai da neurociência moderna" que desenhou o cérebro, uma visão estática desta estrutura se desenvolveu em que informações elétricas e químicas foram pensadas no sentido de serem processadas através de um sistema fixo de circuitos neuronais. Essa visão foi gradualmente revisada a partir de vários estudos mostrando que os circuitos e conexões neuronais estão sujeitos a modificações e reorganizações ao longo da vida após estímulos externos e/ou internos. Essas modificações dinâmicas, denominadas de plasticidade neural, foram demonstradas em vários estudos experimentais, sendo que os resultados encontrados revelaram que a exposição ao estresse pode causar alterações nos processos neurais ou números de neurônios, bem como atrofia dos neurônios piramidais CA₃ do hipocampo e diminuição da proliferação celular no giro dentado (FERRARI; VILLA, 2016).

Além desses achados pré-clínicos, estudos de neuroimagem em pacientes deprimidos revelaram alterações estruturais seletivas em diversas regiões límbicas e não-límbicas como, por exemplo, no córtex pré-frontal e cingulado. Nessas regiões, tanto o metabolismo quanto o volume estão reduzidos, enquanto que a atrofia do hipocampo ocorre com a progressão da síndrome depressiva (GOULD *et al.*, 2000; MANJI; DREVETS; CHARNEY, 2001). Além disso, estudos morfométricos *post mortem* revelaram uma redução significativa das densidades gliais em algumas áreas corticais e límbicas do cérebro (RAJKOWSKA, 2000). Assim, os distúrbios depressivos podem estar associados ao comprometimento da plasticidade estrutural e à resiliência celular, e as terapias farmacológicas antidepressivas podem atuar normalizando esse comprometimento (figura 10) (MANJI; DREVETS; CHARNEY, 2001).

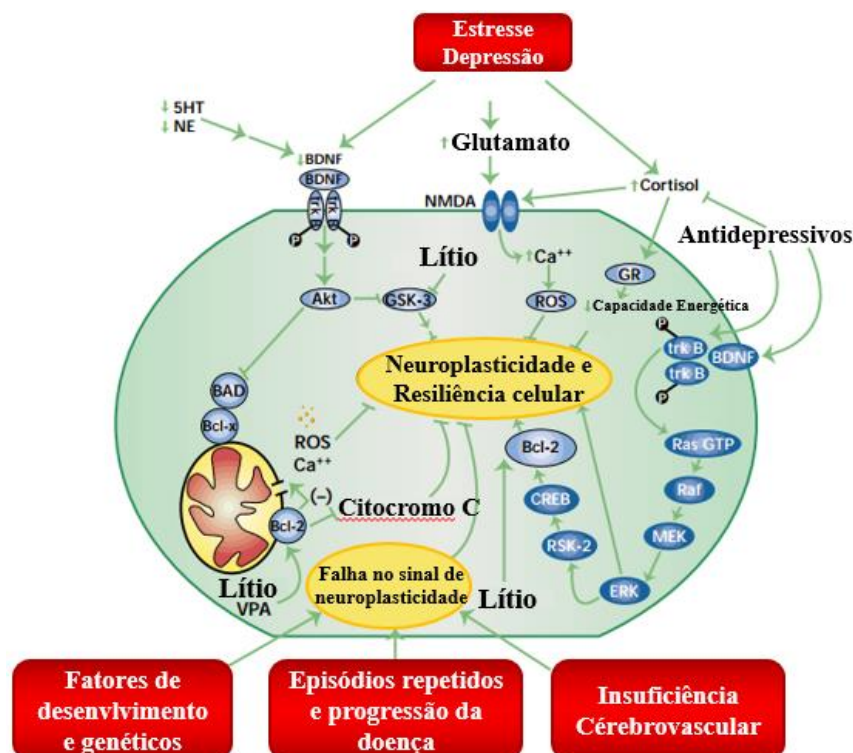


Figura 10. Neuroplasticidade e resiliência celular nos distúrbios do humor.

A figura retrata as múltiplas influências sobre neuroplasticidade e resiliência celular nos distúrbios de humor. Fatores genéticos e de neurodesenvolvimento, episódios afetivos repetidos e progressão da doença podem contribuir para deficiências da resiliência celular, reduções volumétricas e morte/atrofia celular observadas nos distúrbios de humor. O estresse e a depressão provavelmente contribuem para deficiências da resiliência celular por uma variedade de mecanismos, incluindo reduções nos níveis de BDNF, interferência na transmissão glutamatérgica através dos receptores NMDA e não-NMDA e redução da capacidade energética das células. Fatores neurotróficos, como o BDNF, aumentam a sobrevivência celular ao ativar duas vias de sinalização distintas: a via IP3 quinase e a via ERK-MAP quinase. Um dos principais mecanismos pelos quais o BDNF promove a sobrevivência celular é aumentando a expressão da principal proteína citoprotéica, Bcl-2. A Bcl-2 atenua a morte celular através de uma variedade de mecanismos, incluindo o bloqueio da liberação de cálcio e citocromo C, sequestro de enzimas caspases que induzem apoptose e aumento da captação de cálcio mitocondrial. A administração crônica de uma variedade de antidepressivos aumenta a expressão de BDNF e seu receptor TrkB. O lítio e o VPA *upregulam* robustamente a proteína Bcl-2 e, além disso, inibem a GSK-3 β , o que demonstrou efeitos bioquímicos neuroprotetores. O VPA também ativa a via da ERK-MAP quinase, que desempenham um papel importante nos efeitos neurotróficos e na superação das neurites. Abreviações: BDNF, fator neurotrófico derivado do cérebro; trkB, receptor de tirosina quinase para BDNF; NGF, fator de crescimento nervoso; Bcl-2 e Bcl-x, membros anti-apoptóticos da família Bcl-2; BAD e Bax, membros pró-apoptóticos da família Bcl-2; Ras, Raf, MEK, ERK, componentes da via ERK-MAP quinase; CREB, proteína de ligação responsiva ao AMPc; Rsk-2, quinase S-6 ribossomal; ROS, espécies reativas de oxigênio; GR, receptor de glicocorticoide; GSK-3, glicogênio sintase quinase; NDMA, receptor N-metil-D-Aspartato do glutamato; NE, norepinefrina; 5-HT, serotonina; VPA, valproato. FONTE: Adaptado de MANJI; DREVETS; CHARNEY, 2001.

Neste contexto, fatores neurotróficos como o BDNF, o fator de crescimento nervoso (NGF) e a neurotrofina-3 exercem suas ações não só durante o desenvolvimento e maturação neuronal, mas também no cérebro adulto, onde sua expressão é regulada por estímulos como o estresse e drogas psicotrópicas. A exposição ao estresse faz com que a expressão de BDNF seja *downregulada* nos neurônios do giro dentado, CA₃, CA₁ e nas camadas de células piramidais (SMITH *et al.*, 1995) e este processo de *downregulation* pode contribuir para a atrofia dos neurônios CA₃ e redução da neurogênese nas células granulares do hipocampo (DUMAN, 2002).

Em contraste com os efeitos do estresse, a administração subcrônica de antidepressivos aumenta a expressão do BDNF no hipocampo e no córtex frontal (DUMAN, 2002) e estudos comportamentais sustentam a hipótese de que a *upregulation* do BDNF pode contribuir para a ação terapêutica dos antidepressivos. Siuciak e colaboradores (1996) demonstraram que a administração crônica de BDNF no mesencéfalo exerceu uma ação antidepressiva nos modelos do nado forçado e desamparo aprendido, e Shirayama e colaboradores (2000) revelaram que uma única administração de BDNF no hipocampo produz um efeito antidepressivo maciço e duradouro nesses modelos comportamentais.

Esses estudos sugerem que o BDNF está intimamente correlacionado com o estresse, a neurogênese e a atrofia do hipocampo durante episódios de depressão. No entanto, é importante ressaltar que o gene do BDNF é *upregulado* pelo fator de transcrição CREB, cuja expressão é estimulada por tratamentos antidepressivos que aumentam as concentrações de NE e/ou 5-HT na fenda sináptica. Portanto, o BDNF também está fortemente ligado à hipótese monoaminérgica da depressão.

Finalmente, o BDNF pode ser considerado a chave para correlacionar as neurotrofinas com a hipótese inflamatória nos transtornos depressivos, já que os sinais de inflamação foram descritos tanto em MDD quanto em doenças cardiovasculares, e a sinalização das células endoteliais desempenha um papel crucial nas doenças cardiovasculares e neurogênese cerebral através da secreção desta neurotrofina. Dados epidemiológicos robustos apontam para a associação entre MDD e aumento da morbidade e mortalidade cardiovascular (LESPÉRANCE; FRASURE-SMITH, 2007) e os antidepressivos exibiram um importante papel em aumentar a taxa de sobrevivência dos pacientes que desenvolvem depressão após oclusão coronariana (TAYLOR *et al.*, 2005).

2.4.1.5. Anormalidades de neuroimagem nos distúrbios do humor e a teoria mitocondrial da depressão

Paralelamente às hipóteses patogênicas clássicas dos transtornos depressivos, há uma necessidade de novas teorias na perspectiva de minimizar o déficit nas respostas às farmacoterapias atuais em um terço dos pacientes. Nesse mesmo contexto, recentemente surgiu um grande interesse nas alterações bioenergéticas detectadas nos transtornos do humor, levando à formulação de uma hipótese patogênica mitocondrial. O conceito de “psiquiatria mitocondrial” foi usado anteriormente no título de uma revisão sobre sintomas psiquiátricos em distúrbios mitocondriais e alterações mitocondriais em distúrbios psiquiátricos (GARDNER; BOLES, 2005) e como título de capítulo de livro e de uma revisão sobre medicina mitocondrial (DIMAURO *et al.*, 2006; DIMAURO; SCHON, 2008).

Resultados avançados obtidos através de estudos *in vivo* de neuroimagem em pacientes humanos, a partir das observações relacionadas ao fluxo sanguíneo cerebral e da taxa metabólica de glicose permitiram avaliar a presença de anormalidades do metabolismo energético do cérebro no MDD e no distúrbio bipolar. Aumentando progressivamente a profundidade das análises através das avaliações das modificações dos metabólitos e moléculas ligadas a energia ATP, o foco será transferido do tecido cerebral para as células neuronais (FERRARI; VILLA, 2016).

Metodologicamente, o metabolismo energético em amostras de cérebro pode ser estudado por três abordagens diferentes: 1) Determinação dos constituintes do *pool* de adenilato (ATP, adenosina difosfato (ADP), adenosina monofosfato (AMP)), fosfocreatina (PCr) e intermediários relevantes da glicólise e do ciclo de Krebs; 2) Avaliação da fosforilação oxidativa, bem como dos complexos da cadeia respiratória e das enzimas do ciclo de Krebs e ATPases e; 3) Estabelecendo a relação ADP/O₂ (FERRARI; VILLA, 2016)

Além desses métodos bioquímicos clássicos, vários outros métodos foram desenvolvidos para estudar o metabolismo energético cerebral *in vivo* em seres humanos, aplicando técnicas funcionais de neuroimagem, que não medem diretamente a atividade sináptica, mas avaliam indiretamente os sinais resultantes do metabolismo energético dependente dessa atividade (MORETTI; GORINI; VILLA, 2003).

As anormalidades de neuroimagem encontradas no MDD e no distúrbio bipolar corroboraram as hipóteses sobre o circuito neural subjacente à depressão, que

inicialmente se baseou em observações dos efeitos comportamentais de lesões feitas experimentalmente em animais, bem como das manifestações clínicas de lesões ou atrofia decorrentes de distúrbios neurológicos associados ao episódio depressivo maior (PRICE; DREVETS, 2010). As regiões mais comumente afetadas no MDD foram o córtex pré-frontal, o giro cingulado anterior e o lobo temporal, com resultados contrastantes nas sub-regiões dessas áreas, conforme demonstrado por Moretti e colaboradores (MORETTI; GORINI; VILLA, 2003) e exemplificado na figura 11.

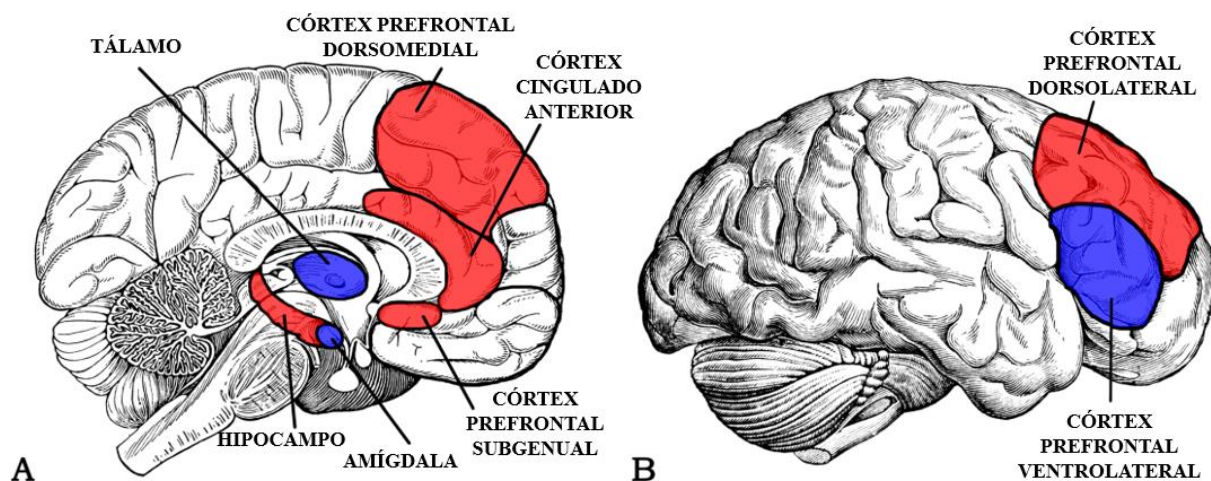


Figura 11. Modificações diferenciais no metabolismo energético cerebral avaliadas através da captação de ^{18}F fluorodeoxiglicose e alterações do fluxo sanguíneo cerebral em estudos de neuroimagem em pacientes deprimidos.

Nas áreas azuis o metabolismo energético está aumentado e nas áreas vermelhas diminuído. FONTE: Adaptado de FERRARI; VILLA, 2016.

Curiosamente, as anormalidades neuromorfométricas parecem estar correlacionadas com o tempo de início do MDD. Em pacientes com distúrbios de humor iniciais, foram observadas estas alterações no córtex pré-frontal orbital e medial e em estruturas anatomicamente relacionadas ao lobo temporal, estriado, tálamo e cingulado posterior (PRICE; DREVETS, 2012). Em contrapartida, indivíduos idosos com depressão de início tardio (idade avançada) apresentaram maior correlação com a doença cerebrovascular, tanto quando comparados à indivíduos do grupo controle (saudáveis) como quando comparados a idosos deprimidos com idade precoce no início da depressão (DREVETS; PRICE; FUREY, 2008).

Muitos estudos de neuroimagem foram desenvolvidos para investigar como os seguintes pontos estão correlacionados com os distúrbios do humor: 1) N-acetilaspártato como marcador da disfunção mitocondrial; 2) Depleção de compostos de alta energia; 3)

Metabolismo de fosfolípidos deficitário e; 4) Alterações do glutamato e sua correlação com o metabolismo energético cerebral. Além disso, pesquisas atuais de suma relevância ressaltam a importância das técnicas de neuroimagem com relação ao metabolismo energético nos distúrbios do humor. No entanto, existem algumas desvantagens como, por exemplo, a falta de tridimensionalidade das imagens obtidas e a capacidade de resolução limitada (FERRARI; VILLA, 2016).

2.4.2. Modelos animais no estudo da depressão

Para que um modelo animal seja considerado ideal ele deve cumprir pelo menos três critérios básicos: 1) Ter validade de face; 2) Validade de constructo e; 3) Validade preditiva (PEREIRA; ANDREATINI, 2013; WILLNER, 1984). Originalmente, McKinney e Bunney (1969) propuseram cinco critérios que um modelo animal deveria atender para ser considerado válido: 1) Analogia de sintomas; 2) Mudanças comportamentais observáveis e mensuráveis; 3) Concordância entre os observadores; 4) Resposta aos tratamentos antidepressivos e; 5) Reprodutibilidade do sistema. Em 1977, Abramson e Seligman (1977) adicionaram um critério adicional, já que esses autores enfatizaram a necessidade de semelhança na etiologia. Atualmente, a maioria dos pesquisadores confia na proposta introduzida por Willner (1984) de três critérios de validade, ou seja, validade de face, preditiva e de constructo, complementados pelo critério de validade etiológica. O conceito geral de validade de constructo foi proposto no campo da psicologia por Cronbach e Meehl (1955) e foi interpretado por Geyer e Markou (1995) para incluir uma variável independente, como condições indutoras semelhantes (etiologia), e variáveis dependentes como, leituras comportamentais para avaliar um fenótipo de depressão.

Para resumir esses critérios os modelos animais devem se assemelhar à condição humana em vários aspectos, incluindo: 1) Semelhança entre o fenótipo comportamental e o perfil clínico-sintomático (validade de face); 2) Melhoria ou atenuação da condição a partir de tratamentos antidepressivos clinicamente efetivos e, contrariamente, ausência de alterações por tratamentos clinicamente ineficazes em humanos (validade preditiva); 3) Desencadeamento do transtorno depressivo através de eventos que são conhecidamente importantes para induzi-lo em seres humanos (validade etiológica) e; 4) Bases neurobiológicas semelhantes (validade de constructo) (FERNANDO; ROBBINS, 2011; KEELER; ROBBINS, 2011).

2.4.2.1. Modelos animais baseados na exposição ao estresse

A hipótese do estresse correlacionado aos transtornos de humor estimulou o desenvolvimento de vários modelos animais que foram usados como substitutos à depressão (GOLD, 2014; HOLLIS; KABBAJ, 2014; SLATTERY; CRYAN, 2014). Esses modelos são baseados em tipos distintos de estresse que podem estar presentes em subconjuntos diferentes de pacientes e distúrbios. Em geral, os diferentes modelos de estresse possuem boa validade etiológicas, de face e de constructo. No entanto, em alguns casos, sua validade preditiva precisa ser comprovada por pesquisas futuras.

2.4.2.1.1. Estresse social

Do ponto de vista biológico o ambiente social parece ser uma fonte considerável de estresse e dois processos são fundamentais para a situação psicossocial dos indivíduos: 1) Luta pelo controle e; 2) Perda de controle (BARNETT, 1958, 1964; HENRY; STEPHENS, 1977). Nos seres humanos, a redução no “*rank/status*” social e/ou controle são exemplos importantes de eventos de perda, que são cada vez mais reconhecidos como um tipo específico de "evento da vida" associado a um maior risco de depressão (Brown, 1993). Com base nisso, novos modelos animais foram estabelecidos e validados utilizando perturbações sociais como agentes estressores. Esses modelos têm valor heurístico (processos cognitivos empregados em decisões não racionais) porque investigam os desafios ambientais que um animal pode encontrar em sua vida cotidiana. Em contextos sociais, isso pode significar perda de controle por frustração social (CZÉH *et al.*, 2016).

O paradigma do residente/intruso, que é específico para roedores, é o modelo mais popular de frustração social/estresse e utiliza conflitos sociais entre membros da mesma espécie para gerar estresse psicológico emocional. Classicamente, neste cenário experimental, um macho, o intruso, é transferido para a gaiola doméstica de outro macho, o residente. Se os animais lutarem em uma única ocasião, é considerado uma exposição aguda ao estresse. Além disso, se o intruso for exposto ao residente em várias ocasiões, variando de dias a semanas, este será considerado como um modelo de estresse crônico. Em alguns modelos, o intruso é transferido para a gaiola de um residente alojado

individualmente, enquanto que em outros casos, o intruso substitui uma fêmea pertencente a gaiola do residente. Em todas as configurações, o intruso é rapidamente atacado e subjugado. Após a exposição física, o intruso é colocado em uma pequena gaiola de proteção antes de retornar à sua gaiola doméstica. Nesta gaiola, o animal é exposto a sinais psicogênicos estressantes que são emitidos pelo residente, sem sofrer danos físicos (HOLLIS; KABBAJ, 2014).

Em várias configurações laboratoriais, este modelo de estresse funciona bem com indivíduos machos. Até recentemente, pensava-se que essa abordagem não funcionaria com as fêmeas porque elas não lutam entre si em um paradigma residente/intruso (PALANZA, 2001). No entanto, estudos recentes demonstraram a frustração social em fêmeas ao utilizar animais idosos e lactantes como residentes (HOLLY *et al.*, 2012). Uma descoberta interessante foi revelada por Jacobson-Pick e colaboradores (2013) onde demonstraram que em camundongos fêmeas, os efeitos comportamentais induzidos pelo estresse foram mais pronunciados 2 semanas após a exposição ao estresse do que 2 horas depois. Após a aplicação desse modelo de depressão em macacos *cynomolgus* adultos fêmeas, os autores concluíram que o estado estressado possui características distintas quando comparado com o estado depressivo e sugeriram que separar o estresse e a depressão em modelos animais pode ser importante para entender cada um desses constructos, bem como sua relação mútua (SHIVELY; WILLARD, 2012).

Koolhaas e colaboradores (1997a), demonstraram que a frustração social é um tipo especial de agente estressor e se distingue de outros paradigmas de estresse em relação à magnitude e qualidade da resposta ao estresse. Além disso, deve-se enfatizar que a frustração social induz mudanças em uma variedade de parâmetros biofisiológicos, sendo que cada alteração pode ter diferentes dinâmicas temporais (KOOLHAAS *et al.*, 1997b). Neste contexto, deve-se mencionar que o período diurno de exposição a um agente estressor é crítico. Os ratos submetidos ao estresse por frustração social crônica durante a fase ativa desenvolveram mais sinais fisiopatológicos do que quando comparados com aqueles submetidos ao estresse durante a fase inativa (BARTLANG *et al.*, 2012).

2.4.2.1.2. Estresse brando crônico e imprevisível

Este foi o modelo escolhido para indução de comportamento anedônico nos animais estudados na presente tese.

O modelo de estresse brando crônico (CMS do inglês, *Chronic Mild Stress*) é um dos modelos mais válidos e realistas de depressão focado em um sintoma central do MDD, a anedonia (em seres humanos) ou comportamento tipo anedônico (em animais) (WILLNER, 2005). O paradigma do CMS envolve a exposição dos animais a uma série de agentes estressores brandos de forma imprevisível como, por exemplo, o isolamento ou gaiola lotada, a privação de alimentos ou água, a alteração do ciclo claro/escuro, a inclinação das gaiolas e a maravalha úmida, sendo que estes agentes podem ser inseridos por um período de várias semanas ou mesmo meses (pelo menos 2 semanas). A vantagem do modelo CMS é que o paradigma do estresse induz mudanças duradouras em parâmetros comportamentais, neuroquímicos, neuroimunológicos e neuroendócrinos que se assemelham às disfunções observadas em pacientes deprimidos (WIBORG, 2013; WILLNER, 1997). Mais importante ainda, o paradigma da CMS induz o comportamento anedônico, como demonstrado por vários testes comportamentais, e este déficit na sensibilidade da recompensa pode ser revertido pelo tratamento antidepressivo crônico (mas não agudo) em humanos (CZÉH *et al.*, 2016).

Historicamente, o primeiro modelo de estresse crônico indutor de anedonia foi desenvolvido por Katz e Hersh (1981). Naquela época, esses autores utilizavam estressores severos, incluindo choque elétrico e natação a frio. Os níveis basais de corticosterona aumentados e uma menor preferência pelo consumo de sacarose sugeriam uma redução na sensibilidade da recompensa, indicando assim uma condição anedônica (KATZ, 1982; KATZ; HERSH, 1981). Com base nessas observações, Willner modificou o paradigma utilizando estressores mais suaves durante um período de tempo mais longo para obter condições de indução mais realistas. Assim, este modelo imita os estressores da vida humana de maneira mais real do que o modelo proposto por Katz (WILLNER *et al.*, 1987; WILLNER; MUSCAT; PAPP, 1992). A severidade dos agentes estressores aplicados é essencial, assim como a apresentação sequencial e imprevisível aos animais (figura 12). O principal objeto de estudo para melhorar o paradigma do CMS foi a simulação de comportamentos semelhantes ao anedônico, sendo que, conseqüentemente, as medidas hedônicas tornaram-se as variáveis primárias neste modelo. A principal variável é o consumo ou preferência de sacarose. Os efeitos induzidos pelo CMS podem ser observados tanto em testes de consumo em bebedouros isolados quanto em testes de preferência de sacarose e água em dois bebedouros simultaneamente (WILLNER, 1997, 2005). Além disso, pesquisas demonstraram que a redução no consumo de sacarose é específica e não está associada a uma diminuição geral no consumo de fluidos, uma vez

que a ingestão de água pura não é afetada pelo paradigma do CMS (HENNINGSEN *et al.*, 2012; WILLNER; MUSCAT; PAPP, 1992).

O teor calórico da sacarose não exerce efeito algum, visto que foram observados efeitos similares quando a sacarose foi substituída por uma solução de sacarina sem calorias (AYENSU *et al.*, 1995; WILLNER *et al.*, 1987). Além disso, uma redução significativa foi observada no consumo de sacarose de animais em jejum e não privados de alimentação (WILLNER, 1997; WILLNER; MUSCAT; PAPP, 1992). Assim, o consumo diminuído de sacarose não é um fenômeno fisiológico, em vez disso, parece ser um fenômeno desenvolvido pelo “transtorno mental”. A diminuição no consumo de sacarose sugere uma diminuição na sensibilidade da recompensa, sendo que esta questão já foi exaustivamente estudada e comprovada (WIBORG, 2013).



Figura 12. Estresse crônico brando e imprevisível em ratos como modelo animal potencial para a depressão, um paradigma que foi desenvolvido por Willner.

A) Ratos Wistar são submetidos a agentes estressores brandos diários durante um período de 8 a 9 semanas em uma ordem aleatória e de maneira imprevisível, o que impõe um estresse severo aos animais; B) A principal vantagem do modelo é que os animais podem ser classificados comportamentalmente com base no consumo de solução de sacarose. Uma fração dos animais reduzirá significativamente a ingestão de sacarose e desenvolverá comportamento anedônico, um sinal central em pacientes deprimidos; C) Um exemplo típico de como os ratos modificam seu consumo de sacarose em resposta ao estresse brando crônico. FONTE: Adaptado de CZÉH *et al.*, 2016.

O protocolo do CMS já está bem estabelecido e foi descrito extensivamente (WIBORG, 2013; WILLNER, 1997, 2005). Tipicamente, os ratos são os sujeitos experimentais de preferência para este modelo, porém os protocolos de CMS também foram desenvolvidos para camundongos (SCHWEIZER; HENNIGER; SILLABER, 2009). O teste de consumo de sacarose é usado para quantificar o estado hedônico dos animais. Os ratos são então divididos, de acordo com a ingestão de sacarose, em dois grupos correspondentes, de modo que tanto a média como o desvio padrão são semelhantes nos dois grupos. Um dos grupos não é submetido ao estresse (grupo controle) e o outro grupo é exposto de forma sequencial a vários agentes estressores de maneira imprevisível (grupo estressado) (como esquematizado na figura 12). Depois de repetir os estresses semanalmente por várias semanas, a maioria dos ratos reduzem de forma gradual e individual o seu consumo de sacarose quando comparados ao grupo controle. Alguns ratos são resistentes e podem lidar com os agentes estressores aplicados para manter a homeostase, enquanto que outros são muito mais vulneráveis ou suscetíveis e entram em um estado anedônico, incluindo a sensibilidade da recompensa reduzida (figura 12). A variabilidade genética de uma linhagem não se manifesta claramente à heterogeneidade na susceptibilidade ao estresse observada na população de ratos. Para comparar os extremos, valores de corte operacionais podem ser utilizados. Desse modo, os ratos com ingestão de sacarose conservada ou consumo reduzido inferior a 10% são definidos como resistentes ao estresse, enquanto que ratos com ingestão reduzida de sacarose superior a 30% são definidos como suscetíveis ao estresse. Um estado de tipo anedônico é gradualmente induzido durante 3 a 4 semanas de estresse (figura 12). Se a exposição ao estresse for interrompida, os ratos se recuperarão gradualmente ao longo de 4 a 5 semanas e outro episódio anedônico pode ser induzido pela retomada da exposição ao estresse. As condições indutoras e a repetição de episódios imitam de maneira muito próxima as condições naturais da vida humana e do MDD. Em conjunto, esses recursos do modelo de CMS são únicos na pesquisa pré-clínica da depressão e acrescentam validade etiológica ao modelo. Se o paradigma do estresse for sustentado, um estado semelhante ao anedônico pode ser mantido por meses e os ratos são incapazes de se habituar a agentes estressores devido à natureza imprevisível do regime de estresse imposto. Alternativamente, se a exposição ao estresse for combinada com o tratamento antidepressivo crônico, os ratos se recuperaram do estado anedônico, no entanto, cerca de 50%, deles serão refratários ao tratamento, que é muito semelhante à refratariedade do tratamento terapêutico. Sendo assim, a condição refratária ao tratamento é outra

característica única do modelo de CMS (CHRISTENSEN; BISGAARD; WIBORG, 2011; WIBORG, 2013).

2.4.3. Teste do nado forçado

Existem muitos modelos utilizados para o estudo do MDD, como por exemplo, o teste de preferência de sacarose, já discutido anteriormente e o teste de suspensão de cauda. No entanto, o teste do nado forçado (FST, do inglês *Forced Swimming Test*, também conhecido como teste de Porsolt, o desenvolvedor deste modelo (PORSOLT; BERTIN; JALFRE, 1977; PORSOLT; LE PICHON; JALFRE, 1977) é um dos ensaios mais comumente utilizados nas pesquisas pré-clínicas que envolvem a depressão (CRYAN; MARKOU; LUCKI, 2002; DORON *et al.*, 2014; PORSOLT; LE PICHON; JALFRE, 1977).

Durante o FST, um animal é colocado em um recipiente cheio com água de modo que não possa escapar. Primariamente, o animal tentará escapar, mas eventualmente exibirá imobilidade, ou seja, flutuará com a ausência de qualquer movimento, exceto aqueles necessários para manter o nariz acima da água (figura 13). O FST é um modelo muito popular na pesquisa pré-clínica por vários motivos. Primeiro, envolve a exposição dos animais ao estresse, o que demonstrou ter um papel importante na tendência para o MDD (DORON *et al.*, 2014; KAUFMAN *et al.*, 2006). Além disso, a depressão é muitas vezes vista como uma falta de capacidade de lidar com o estresse (ANISMAN; ZACHARKO, 1990; SULLIVAN; NEALE; KENDLER, 2000). Em segundo lugar, o tratamento farmacológico com antidepressivos antes do teste reduziu o tempo de imobilidade no FST (CRYAN; MARKOU; LUCKI, 2002; LÓPEZ-RUBALCAVA; RITTENHOUSE; LUCKI, 1997). Portanto, muitas vezes este teste é utilizado nos *screenings* para novos compostos com potenciais propriedades antidepressivas. Além disso, pesquisas demonstraram que o FST compartilha alguns dos fatores que são influenciados ou alterados pela depressão em seres humanos, como, por exemplo, mudanças no consumo de alimentos, anormalidades do sono e anedonia induzida pela abstinência a drogas (ANISMAN; ZACHARKO, 1990; CRYAN; MOMBÉREAU; VASSOUT, 2005; SULLIVAN; NEALE; KENDLER, 2000). Esta é também a razão pela qual esse teste muitas vezes é utilizado para avaliar o comportamento depressivo em camundongos *knockout*, com aumento ou diminuição da imobilidade basal quando

comparados aos camundongos selvagens (CRYAN; MOMBÉREAU, 2004; SANG *et al.*, 2005).

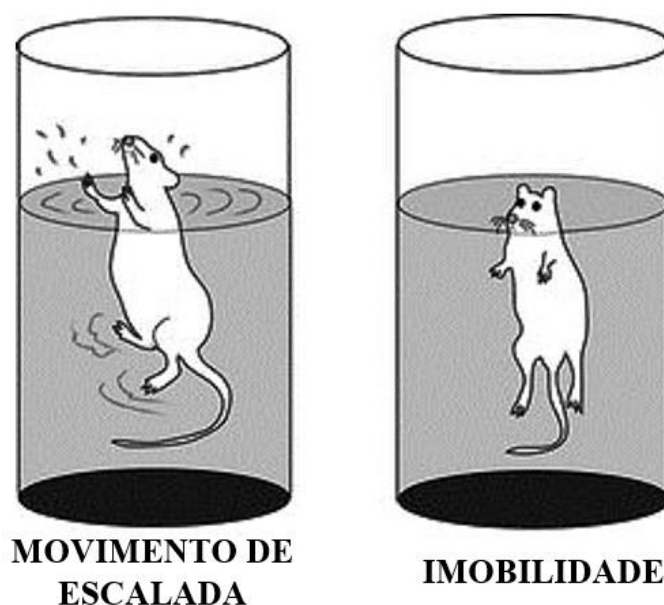


Figura 13. Representação esquemática da mobilidade e imobilidade no teste do nado forçado. FONTE: Adaptado de: (KUTEEVA *et al.*, 2010).

O FST baseia-se no pressuposto de que a imobilidade reflete uma medida de “desesperança” comportamental (CRYAN; HOLMES, 2005). As principais vantagens desse procedimento são a operacionalização relativamente fácil e os resultados rápidos. Além disso, a sua sensibilidade a uma ampla gama de medicamentos antidepressivos, que o tornam um teste de *screening* adequado, é uma das características mais importantes que conduzem à sua alta validade preditiva (BORSINI; MELI, 1988). Além disso, este teste também permite a diferenciação entre os efeitos produzidos por medicamentos que não são destinados ao tratamento de depressão, como, por exemplo, os benzodiazepínicos, que possuem efeitos ansiolítico (CRYAN; HOLMES, 2005; REINHOLD *et al.*, 2011). Outro exemplo da importância do FST no estudo da depressão, que também contribui para a validade de face, é o fato de que os modelos de predisposição à depressão influenciam o comportamento da imobilidade. Por exemplo, modelos de depressão em animais geneticamente modificados têm sido reproduzidos com sucesso com base na imobilidade no FST (WEISS; KILTS, 1998), sugerindo que a imobilidade é determinada por um traço hereditário, embora algumas linhagens tenham demonstrado uma imobilidade elevada no FST (ARMARIO; GAVALDÀ; MARTÍ, 1995; PARÉ, 1994). Além disso, é importante mencionar que os modelos genéticos que não são baseados no

desempenho no FST demonstraram ser ótimos como fonte de modelos válidos para o estudo do comportamento depressivo (CRYAN; HOLMES, 2005; OVERSTREET *et al.*, 2005).

Além da pesquisa genética, o comportamento de imobilidade no FST mostrou-se influenciado em vários modelos animais que estão ligados à predisposição à depressão, como exposição precoce ao estresse (BIELAJEW *et al.*, 2003; FUJISAKI, 2003), diabetes clínico (GOMEZ *et al.*, 2003; HILAKIVI-CLARKE *et al.*, 1990) e abstinência de drogas (CRYAN; HOYER; MARKOU, 2003).

Apesar da sua ampla utilização na pesquisa pré-clínica, foram levantadas ressalvas quanto à sua validade de constructo que lançam dúvidas do FST como sendo um modelo para a depressão. Por exemplo, em pacientes deprimidos o tempo necessário de tratamento para o aparecimento de algum efeito terapêutico é de pelo menos várias semanas (BORDET; THOMAS; DUPUIS, 1998; PORTELLA *et al.*, 2011) Isso levanta a questão de saber se a imobilidade no FST e a depressão compartilham as mesmas mudanças adaptativas de longo prazo nos circuitos neuronais subjacentes aos efeitos dos antidepressivos em seres humanos. Dito isso, é importante mencionar que vários estudos recentes demonstraram efeitos antidepressivos neste teste após tratamento crônico em doses muito menores do que as necessárias para induzir efeitos (CRYAN; MOMBÉREAU; VASSOUT, 2005; DULAWA *et al.*, 2004). Outra questão muito discutida é o significado preciso do comportamento da imobilidade como uma medida que reflete os sintomas da depressão (CRYAN; MOMBÉREAU, 2004; CRYAN; VALENTINO; LUCKI, 2005). É importante notar que a imobilidade nestes testes parece ser o resultado de uma incapacidade ou relutância em manter o esforço em vez de uma hipoatividade generalizada. Dessa mesma maneira, pacientes que sofrem de depressão apresentam deficiências psicomotoras, particularmente nos testes que exigem a duração do esforço (WILLNER, 1990). Os comportamentos ativos neste modelo (lutando e nadando) poderiam levar o animal a escapar e, como resultado, diminuir o estresse, enquanto que o comportamento passivo (a imobilidade) pode preservar a energia enquanto espera por uma possível fuga. A escolha do comportamento do animal varia e depende de vários fatores como, por exemplo, pré-exposição, *status* de energia, tratamento, entre outros. O tratamento com ISRSs exibiu um retardo na transição das estratégias de enfrentamento ativo para passivo, ao passo que fatores associados à depressão aceleram esta transição (CRYAN; VALENTINO; LUCKI, 2005). Além disso, foram levantadas algumas questões quanto à imobilidade como um processo aprendido,

o que significa que o animal pode aprender que a melhor a solução seria ser passivo e esperar para ser removido da água, o que foi descrito como a imobilidade aprendida (DE PABLO *et al.*, 1989; JEFFERYS; FUNDER, 1994). No entanto, pode-se afirmar que esse ponto de vista leva a uma perspectiva antropomórfica desse modelo. Além disso, não foi encontrada correlação negativa entre a duração da imobilidade prolongada e os hormônios do estresse (DAL-ZOTTO; MARTÍ; ARMARIO, 2000; RITTENHOUSE *et al.*, 2002). Além disso, verificou-se que os ISRSs reduzem a imobilidade em uma única sessão de teste após administração crônica em ratos (OVERSTREET; KEENEY; HOGG, 2004) ou mesmo após administração aguda em camundongos (BORSINI; MELI, 1988), sugerindo que o efeito dos ISRSs não está relacionado com a imobilidade.

Outro ponto importante é o papel dos comportamentos ativos durante a FST. Embora a imobilidade seja o comportamento que normalmente é apresentado nos artigos, as outras duas medidas também mostraram ser significativas. Especificamente, os antidepressivos que aumentam a neurotransmissão serotoninérgica produziram um aumento na duração da natação, ao passo que aqueles que aumentam a neurotransmissão catecolaminérgica exibiram tempo de natação ainda mais prolongado (CRYAN; VALENTINO; LUCKI, 2005). Isso pode contribuir para a distinção entre os mecanismos neuroquímicos subjacentes a esse comportamento em diferentes experimentos. Esta situação também foi observada em ratos, principalmente, (CHAKI *et al.*, 2004; ESTRADA-CAMARENA; FERNÁNDEZ-GUASTI; LÓPEZ-RUBALCAVA, 2003) e pode ser a causa do porquê os resultados à administração de escitalopram (um ISRS) resultaram no aumento da luta, mas não o comportamento de natação.

Além disso, devido ao fato de que alguns antidepressivos reduzem a atividade locomotora e também que medicamentos estimulantes psicomotores demonstraram reduzir a imobilidade no FST (CRYAN; VALENTINO; LUCKI, 2005; ESTRADA-CAMARENA; FERNÁNDEZ-GUASTI; LÓPEZ-RUBALCAVA, 2004; HEMBY *et al.*, 1997), porém, não são eficazes para o tratamento da depressão, recomenda-se que sejam realizados testes de atividade locomotora, além do FST, para excluir que o nível de atividade basal não seja o fator determinante neste teste. Nesse sentido, devido à aversão que o FST causa nos animais, é importante levar em conta as possíveis influências que isso possa ter sobre a estrutura/função do cérebro se as análises cerebrais forem realizadas seguindo este procedimento. Ao se realizar uma série de testes comportamentais, se os outros paradigmas não forem considerados estressantes, recomenda-se que o FST seja o último ensaio a ser realizado (YANKELEVITCH-YAHAV *et al.*, 2015).

Por fim, embora no passado este procedimento tenha sido submetido à possibilidade de viés devido ao experimentador, é cada vez mais comum o uso de *softwares* especializados de análise comportamental que eliminam essa desvantagem (DORON *et al.*, 2014; EINAT, 2014; GERSNER; GORDON-KIWKOWITZ; ZANGEN, 2009).

2.4.4. Tratamento farmacológico da depressão

Os antidepressivos atuais diferem dos medicamentos mais antigos devido à redução da incidência de efeitos adversos e a maior especificidade de ação nos sistemas neuroquímicos. No entanto, não houve grandes avanços nas taxas de resposta aos antidepressivos e quanto ao tempo de início do efeito terapêutico (demasiadamente lento), exigindo várias semanas de tratamento crônico para atingir o efeito total. Quanto ao desenvolvimento de tolerância houve melhora, mas as diferenças de eficácia são pequenas e difíceis de serem demonstradas, e há poucas evidências de que os antidepressivos mais novos são mais eficazes do que os antidepressivos mais antigos. Um antidepressivo antigo, a clomipramina (um ADT inibidor da recaptação de serotonina e noradrenalina (IRSN)), permanece entre os mais eficazes, paralelamente à venlafaxina (um inibidor da recaptação de serotonina, noradrenalina e dopamina IRSND), aos ISRSs como, por exemplo, a sertralina e o escitalopram, e ao antidepressivo atípico mirtazapina (CIPRIANI *et al.*, 2009; MONTGOMERY *et al.*, 2007). De maneira geral, os antidepressivos têm demonstrado consistentemente taxas de respostas terapêuticas apenas moderadas, com cerca de 30-40% dos pacientes sendo classificados como refratários ao tratamento e a latência do início do efeito clínico continua prolongado (HOLTZHEIMER; MAYBERG, 2011; TRIVEDI *et al.*, 2006). Embora a eficácia dos antidepressivos tenha sido postulada para uma série de fármacos não monoaminérgicos que são comercializados para outros fins terapêuticos, a relativa falta de progresso nos últimos 50 anos é notável (BAGHAI *et al.*, 2011; BLIER; BLONDEAU, 2011).

A teoria monoaminérgica da depressão propõe um mecanismo único tanto para depressão quanto para o mecanismo de ação das drogas antidepressivas, ou seja, depressão resulta de uma diminuição na neurotransmissão de NE e/ou 5-HT e os antidepressivos normalizam essa redução. A mesma simetria é vista na maioria das demais teorias, no entanto, esta hipótese simétrica é falha. Existem muitas diferenças nas bases neurobiológicas da depressão e ação antidepressiva, sendo que a ação dos

antidepressivos não pode ser descrita com precisão apenas como um aspecto de reversão e/ou normalização dos processos que estão disfuncionais no cérebro deprimido (WILLNER; SCHEEL-KRÜGER; BELZUNG, 2013).

A evidência mais clara de que o cérebro de um paciente tratado com antidepressivo não está em um estado normal vem de estudos que evidenciaram que os efeitos antidepressivos são bloqueados agudamente. Além disso, pesquisas têm demonstrado que após pacientes com depressão terem sido tratados com sucesso com os ISRS e, posteriormente, terem recebido uma dose baixa de sulpirida, um antagonista dos receptores dopaminérgicos D2, houve uma reincidência profunda do humor deprimido. No entanto, em paciente não deprimidos do grupo controle, o humor manteve-se normal (WILLNER; HALE; ARGYROPOULOS, 2005). Exatamente o mesmo efeito é observado nos estudos de depleção de 5-HT ou NE. O consumo de uma mistura de aminoácidos com ausência de triptofano, o precursor da 5-HT, leva rapidamente a uma diminuição de 70-80% nos níveis plasmáticos de triptofano e, conseqüentemente, na redução dos níveis de 5-HT no cérebro. Além disso, o inibidor da enzima tirosina hidroxilase, o alfa-metil-*p*-tirosina (AMPT), provoca uma depleção seletiva das catecolaminas DA e NA. A depleção de triptofano provoca uma reincidência severa dos sintomas do MDD na maioria dos pacientes em remissão após tratamento bem-sucedido com os ISRS (DELGADO, 1990; DELGADO *et al.*, 1999). Da mesma forma, o AMPT desenvolve recaída similar em pacientes deprimidos tratados com sucesso com inibidores seletivos da recaptação de NE (ISRN) (DELGADO *et al.*, 1993; MILLER *et al.*, 1996). No entanto, nenhuma dessas manipulações possuem efeitos importantes sobre o humor de pessoas que não estão deprimidas (RUHÉ; MASON; SCHENE, 2007).

Resultados semelhantes foram relatados em estudos com animais. Tanto a depleção de 5-HT quanto a depleção de NE bloqueiam a ação dos antidepressivos ISRSs e ISRNs, respectivamente, em modelos animais de depressão. No entanto, da mesma forma que em humanos, ao reverter os efeitos dos antidepressivos, nenhuma manipulação produziu um fenótipo depressivo em animais não tratados (CRYAN *et al.*, 2004; LUCKI; O'LEARY, 2004; YALCIN *et al.*, 2008). O CMS é um modelo de depressão bem validado, com base no desenvolvimento de um estado anedônico, ou seja, na perda de capacidade de resposta às recompensas de animais submetidos à uma variedade de agentes estressores brandos (como já discutido anteriormente) (WILLNER, 1997; WILLNER *et al.*, 1987). Em um estudo transcriptômico de grande escala em ratos, o CMS induziu uma mudança molecular nas regiões mesocorticolímbicas do cérebro, que

foi parcialmente revertida pela fluoxetina. Nesse caso, a fluoxetina não conseguiu bloquear mais de um quarto das alterações na amígdala e córtex cingulado e quase três quartos das mudanças no hipocampo, embora o comportamento dos ratos tenha voltado ao normal após o tratamento (SURGET *et al.*, 2009).

É evidente que os antidepressivos não normalizam a atividade do cérebro. Tanto o humor como o comportamento normalizam, no entanto, o cérebro tratado com antidepressivo é caracteristicamente distinto do cérebro não deprimido. Isso também é evidenciado pela alta taxa de recaída quando os antidepressivos são retirados de maneira abrupta após a remissão dos sintomas (KAYMAZ *et al.*, 2008). Portanto, são necessários estudos separados da neurobiologia da depressão e dos mecanismos de ação das drogas antidepressivas, ao invés de combinar essas duas questões (WILLNER; SCHEEL-KRÜGER; BELZUNG, 2013).

2.4.4.1. Mecanismos de ação das principais drogas antidepressivas

2.4.4.1.1. Potencialização da neurotransmissão monoaminérgica

É intuitivo pensar que os fármacos antidepressivos atuem principalmente através de mecanismos monoaminérgicos, porém, debates consideráveis vêm sendo realizados na literatura sobre se eles potencializam a transmissão em sinapses monoaminérgicas, como originalmente proposto, ou a reduzem (SEGAL; KUCZENSKI; MANDEL, 1974). No entanto, estudos de depleção de neurotransmissores fornecem fortes evidências de que a ação primária de drogas antidepressivas é concebida originalmente devido ao aprimoramento da neurotransmissão em sinapses serotoninérgicas e noradrenérgicas. Tanto em estudos com humanos como com animais, os efeitos dos ISRSs são bloqueados por antagonistas serotoninérgicos, enquanto os efeitos dos ISRNs são bloqueados por antagonistas noradrenérgicos. Quanto à localização das sinapses destes sistemas neurotransmissores, há evidências de que as ações antidepressivas podem ser antagonizadas por intervenções no hipocampo ou córtex pré-frontal (BONDI; JETT; MORILAK, 2011; FURR; DANET LAPIZ-BLUHM; MORILAK, 2012).

A seletividade clínica dos antidepressivos ISRSs e ISRNs à depleção de 5-HT (DELGADO, 1990; DELGADO *et al.*, 1999) e NE (DELGADO *et al.*, 1993; MILLER *et al.*, 1996), respectivamente, também demonstram outro ponto importante: Os

antidepressivos seletivos para os sistemas de 5-HT e de NE atuam através de mecanismos distintos, envolvendo sinapses serotoninérgicas e noradrenérgicas, respectivamente. Estudos de ação antidepressiva em modelos animais de depressão demonstram esses efeitos. A depleção de 5-HT bloqueia de forma específica os efeitos dos ISRSs em modelos animais de depressão sem afetar a ação dos ISRNs. Estudos de depleção de NA exibiram essencialmente o padrão oposto; camundongos *knockout* para NE não respondem a nem um dos grupos de antidepressivos, ISRNs ou ISRSs (CRYAN *et al.*, 2004; LUCKI; O'LEARY, 2004), o que pode refletir o fato de que os neurônios serotoninérgicos no núcleo da rafe dorsal (DRN, do inglês *Dorsal Raphe Nucleus*) são bloqueados na ausência completa de entradas noradrenérgicas no *locus coeruleus* (GARTSIDE; UMBERS; SHARP, 1997; TREMBLAY; BLIER, 2006). Uma limitação desses estudos é que eles envolveram tratamento antidepressivo agudo em modelos que são úteis como testes de *screening* para drogas antidepressivas (testes do nado forçado e de suspensão de cauda), provavelmente porque refletem principalmente a atividade aprimorada dos sistemas monoaminérgicos no cérebro normal de roedores, mas possuem baixa validade como modelos de depressão (WILLNER; MITCHELL, 2002). No entanto, os efeitos semelhantes foram descritos no modelo de CMS e, neste caso, o tratamento crônico com o citalopram, um ISRS, e desipramina, um ISRN, reverteu os distúrbios cognitivos dos animais submetidos ao modelo. Tais efeitos foram bloqueados pela administração aguda de antagonistas, serotoninérgicos e noradrenérgicos, respectivamente (BONDI; JETT; MORILAK, 2011; FURR; DANET LAPIZ-BLUHM; MORILAK, 2012).

2.4.4.1.2. Mecanismos de ação antidepressivos pós-transducionais e neurogênese

A figura 14 resume os mecanismos pós-sinápticos envolvidos no aumento das concentrações sinápticas das monoaminas. Com a única exceção do receptor 5HT₃, as ações sinápticas da 5-HT e NE são mediadas pela sua ligação aos receptores acoplados à proteína G que estimulam ou inibem a síntese do segundo mensageiro intracelular AMPc. Isso leva, por sua vez, a mudanças na atividade da PKA, que interage de forma complexa com outras proteínas quinases (MAPK (do inglês, *Mitogen Activated Protein Kinases*) e CaMK (proteína quinase dependente de cálcio/calmodulina)), resultando em alterações na atividade do fator de transcrição nuclear CREB. Após a administração crônica, porém não aguda, os antidepressivos de todas as classes demonstraram aumentar a expressão de

CREB no hipocampo (NIBUYA; NESTLER; DUMAN, 1996). O controle da expressão de CREB é relativamente bem compreendido, mas os mecanismos precisos pelos quais os antidepressivos estimulam este fator de transcrição ainda permanecem incertos (TARDITO *et al.*, 2006). No entanto, três observações relevantes são pertinentes: 1) O receptor crítico para os efeitos mediados pela 5-HT é o $5HT_{1A}$ (SANTARELLI *et al.*, 2003); 2) A ativação do receptor $5HT_{1A}$ inibe a PKA, mas estimula MAPK (POLTER; LI, 2010) e; 3) A inibição da via MAPK bloqueia os efeitos dos antidepressivos serotoninérgicos e noradrenérgicos no teste do nado forçado (DUMAN *et al.*, 2007). Além disso, tudo indica que a via MAPK é responsável pelo aumento da expressão de CREB pelos antidepressivos. Por outro lado, a expressão de CREB diminuiu, especificamente, no giro dentado do hipocampo, em ratos anedônicos submetidos ao modelo de CMS (GRØNLI *et al.*, 2006). Pesquisas *post mortem* revelaram que a expressão de CREB estava reduzida em cérebros de pacientes deprimidos vítimas de suicídio. Por outro lado, estudos demonstraram que a expressão deste fator de transcrição estava aumentada devido ao tratamento antidepressivo *pre mortem* (PITTENGER; DUMAN, 2008). Em modelos animais, a superexpressão de CREB exibiu efeito antidepressivo (BLENDY, 2006). No entanto, esses efeitos são específicos de uma região cerebral, já que a desipramina e a fluoxetina diminuíram a função CREB, bem como a expressão do gene alvo regulado por ele no núcleo *accumbens* e bloquearam os efeitos do estresse (CHARTOFF *et al.*, 2009; NEWTON *et al.*, 2002).

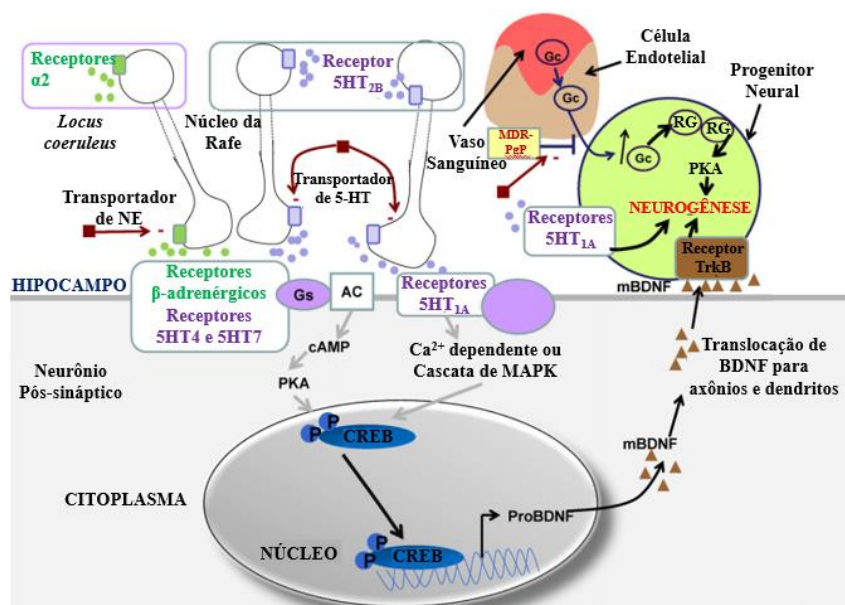


Figura 14. Mecanismos celulares e moleculares de ação das drogas antidepressiva (setas vermelhas).

Os antidepressivos atuam ao aumentar os níveis de 5HT (círculos azuis/roxos) e/ou NE (círculos verdes), o que geralmente ocorre através da inibição dos transportadores de 5-HT e/ou NE. A serotonina liga-se aos

auto-receptores positivos (estimulantes) 5-HT_{2B} localizados no núcleo de rafe e aos receptores pós-sinápticos 5-HT_{1A}, 5-HT₄ e 5-HT₇ no hipocampo, bem como aos receptores 5-HT_{1A} localizados em células progenitoras neurais do hipocampo. A NE se liga aos auto-receptores α_2 localizados no *locus coeruleus* e aos receptores β -adrenérgicos do hipocampo. Nos neurônios pós-sinápticos do hipocampo, a ativação dos receptores serotoninérgicos e noradrenérgicos provoca a ativação de uma cascata citoplasmática de mensageiros intracelulares. Os receptores adrenérgicos, bem como os receptores 5-HT₄ e 5-HT₇ são do tipo acoplados à proteína Gs, de modo que sua estimulação ativará sequencialmente a adenilil ciclase com consequente síntese de AMPc que, por sua vez, ativará a PKA. Por outro lado, os receptores 5-HT_{1A} são acoplados à proteína Gi ou Gq, o que ativa as cascatas dependentes de Ca²⁺ e/ou MAPK. Todas estas vias conduzem à fosforilação de CREB no núcleo da célula, o que induz a transcrição do gene de BDNF que sintetiza o pró-BDNF. No citoplasma, o pró-BDNF é convertido em mBDNF, que é então transportado até os dendritos e axônios. Uma vez liberado, o mBDNF se liga aos receptores TrkB localizados em células progenitoras neurais, o que contribui para a maturação dessas células e sua diferenciação em novos neurônios do hipocampo. As seguintes ações demonstraram ser essenciais para os efeitos comportamentais neurogênicos e antidepressivos dos ISRSs: 1) Estimulação dos auto-receptores 5HT_{2B}; 2) Inibição da recaptção de 5HT sináptica; 3) Estimulação dos receptores 5-HT_{1A} pós-sinápticos e; 4) Estimulação de MAPK, CREB e BDNF. Paralelamente, os antidepressivos inibem as bombas presentes na membrana celular, como, por exemplo, o MDR-PGP e aumentam o acesso de glicocorticoides (GC) ao cérebro, resultando em um nível intracelular elevado de glicocorticoides, que se liga aos receptores de glicocorticoides (RG). (Esses efeitos foram demonstrados em células-tronco embrionárias. A figura pressupõe que ocorre um processo semelhante nos progenitores neurais, porém, não se sabe se isso ocorre também em neurônios maduros.) Após a ligação aos RGs, os glicocorticoides induzem a ativação da PKA, aumentando, conseqüentemente, a neurogênese (provavelmente pela via CREB-BDNF). Os RGs também são translocados para o núcleo, onde o receptor ativado pode ativar ou bloquear a transcrição de genes específicos, o que leva a resensibilização do RG. FONTE: Adaptado de WILLNER; SCHEEL-KRÜGER; BELZUNG, 2013.

O CREB é um membro de uma imensa família de fatores de transcrição estrutural e funcionalmente relacionados, que também incluem isoformas do Elemento Modulador de Resposta ao AMPc (CREM), do repressor transcricional ICER (do inglês, *Inducible AMPc Early Repressor*) e de fatores de transcrição ativados (ATFs, do inglês, *Activating Transcription Factors*). Estas proteínas regulam a transcrição gênica de genes específicos. Os fatores ATF2, ATF3 e ATF4 são induzidos pelo estresse no núcleo *accumbens* e sua superexpressão mediada por vírus induz comportamentos relacionados à emoção, sendo que a superexpressão de ICER ou de ATF2 provoca comportamentos depressivos enquanto a expressão excessiva de ATF3 e ATF4 tem o efeito oposto (GREEN *et al.*, 2008). A indução de CREB na amígdala basolateral produz respostas

semelhantes ao efeito antidepressivo no modelo de desamparo aprendido (WALLACE *et al.*, 2004).

O CREB regula a atividade de vários genes, com consequentes mudanças na síntese de diferentes proteínas, sendo o mais estudado o, BDNF. Assim como o CREB, as concentrações de BDNF e os níveis de expressão para o seu mRNA no hipocampo estão diminuídos devido ao estresse crônico e aumentados após tratamento com antidepressivos, embora não seja sempre observado aumento específico de BDNF (CASTRÉN; VÖIKAR; RANTAMÄKI, 2007; COPPELL; PEI; ZETTERSTRÖM, 2003; DUMAN; MONTEGGIA, 2006; MARTINOWICH; MANJI; LU, 2007; MOLTENI *et al.*, 2006; NIBUYA; MORINOBU; DUMAN, 1995; RUSSO-NEUSTADT; BEARD; COTMAN, 1999). Em estudos *post mortem*, os níveis de BDNF, semelhantemente ao CREB, estão reduzidos nos cérebros de pacientes vítimas de suicídio, porém, aumentados após o tratamento antidepressivo *pre mortem* (PITTENGER; DUMAN, 2008). Um aumento nos níveis de mRNA para BDNF no hipocampo também foi observado após a eletroconvulsoterapia (ECT) (DUMAN; VAIDYA, 1998; NIBUYA; MORINOBU; DUMAN, 1995; ZETTERSTRÖM; PEI; GRAHAME-SMITH, 1998). Esses efeitos corroboram com os achados clínicos, uma vez que o aumento do BDNF é observado somente após o tratamento antidepressivo crônico, com exceção da ECT, onde o efeito é observado mais rapidamente (WILLNER; SCHEEL-KRÜGER; BELZUNG, 2013).

A resposta ao tratamento antidepressivo no teste do nado forçado foi bloqueada em camundongos *knockout* para o receptor Trk-B de BDNF (DELTHEIL *et al.*, 2008; IBARGUEN-VARGAS *et al.*, 2009; MONTEGGIA *et al.*, 2004; SAARELAINEN *et al.*, 2003).. Em animais *knock-down* para BDNF região-específico no giro dentado ou *subiculum* ventral do hipocampo (mas não nos neurônios CA₁ ou CA₃) foi observada indução de comportamento semelhante à depressão e resistência aos efeitos das drogas antidepressivas como a desipramina e o citalopram (ADACHI *et al.*, 2008; TALIAZ *et al.*, 2010). Por outro lado, uma única infusão de BDNF no hipocampo produziu uma recuperação duradoura do comportamento depressivo no modelo de desamparo aprendido, comparável ao efeito do tratamento antidepressivo sistêmico crônico (SHIRAYAMA *et al.*, 2002). Em contraste com esses efeitos no hipocampo, o BDNF aumentou o comportamento depressivo quando injetado na área tegmental ventral (VTA), enquanto que a inibição da sinalização BDNF no núcleo *accumbens* tem o efeito oposto (BERTON *et al.*, 2006; EISCH *et al.*, 2003; KRISHNAN; NESTLER, 2008). Assim, como CREB, os efeitos do BDNF são específicos para uma determinada região do

cérebro, com efeitos opostos no hipocampo e núcleo *accumbens*. No entanto, o tratamento sistêmico crônico com BDNF demonstrou um importante efeito antidepressivo (SCHMIDT; DUMAN, 2010), sugerindo que o seu efeito ocorre predominantemente no hipocampo.

As neurotrofinas possuem múltiplos papéis no desenvolvimento do sistema nervoso e também no cérebro de indivíduos adultos; influenciam a plasticidade sináptica, a morfologia dos espinhos dendríticos e a proliferação, diferenciação e sobrevivência dos neurônios (KANDEL, 2001; SCHMIDT; DUMAN, 2007). No cérebro de mamíferos adultos, novos neurônios são encontrados principalmente no giro dentado do hipocampo e, em menor grau, no bulbo olfatório, embora algumas evidências sugiram que a neurogênese também pode ocorrer em outras áreas, incluindo o hipotálamo, amígdala, neocórtex, córtex piriforme, substância nigra e estriado (GOULD, 2007). Na zona subgranular do giro dentado, os novos neurônios são originários de um processo que inclui estádios diferentes; as células tipo 1 (células-tronco tipo glia-radial) dividem-se produzindo outras células tipo 1, o que lhes permite manter-se, bem como gerar células filhas de Tipo 2 (células progenitoras neurais). Estas dividem simetricamente a produção de células Tipo 3 (neuroblastos) que migram para a camada celular dos grânulos. As células do tipo 4 são pós-mitóticas e estendem os seus axônios em direção à região CA₃, levando ao desenvolvimento de células granulares maduras (WILLNER; SCHEEL-KRÜGER; BELZUNG, 2013).

A administração crônica de BDNF diretamente no hipocampo aumenta a neurogênese (SCHARFMAN *et al.*, 2005), que, como discutido anteriormente, é bloqueada pelo estresse crônico (HANSON; OWENS; NEMEROFF, 2011; SAMUELS; HEN, 2011). A injeção periférica crônica do BDNF também aumenta a sobrevivência das células recém-nascidas do hipocampo em (SCHMIDT; DUMAN, 2010). Os tratamentos antidepressivos crônicos aumentam a neurogênese no hipocampo. Este efeito ocorre apenas no giro dentado do hipocampo (SURGET *et al.*, 2008) e foi demonstrado não apenas com antidepressivos clássicos disponíveis no mercado, mas também com antidepressivos putativos de classes farmacológicas muito diferentes, incluindo drogas que atuam em alvos monoaminérgicos (MALBERG *et al.*, 2000; MANEV; UZ; MANEV, 2001), glutamatérgicos (YOSHIMIZU; CHAKI, 2004), canabinoides (JIANG *et al.*, 2005) e compostos que atuam sobre o eixo HPA tal como os antagonistas dos receptores CRF1 de corticotrofina, V1b da vasopressina (ALONSO *et al.*, 2004) e do MCH (DAVID; KLEMENHAGEN; HOLICK, 2007). O aumento da neurogênese no

hipocampo também é observado em animais com outros tratamentos que possuem efeitos semelhantes aos antidepressivos em roedores, como exercícios físicos (KRONENBERG *et al.*, 2003; VAN PRAAG; KEMPERMANN; GAGE, 1999) ou o enriquecimento do ambiente de desenvolvimento dos animais (KRONENBERG *et al.*, 2003; SCHLOESSER *et al.*, 2010; VEENA *et al.*, 2009). O efeito estimulante da neurogênese desenvolvido pelos antidepressivos em roedores adultos não é observado em animais muito jovens ou muito velhos (COUILLARD-DESPRES *et al.*, 2009; HODES *et al.*, 2009), e isso pode ser relevante para a resistência ao tratamento antidepressivo em crianças e adultos mais velhos.

Curiosamente, os progenitores neuronais e os neurônios imaturos expressam o receptor TrkB para BDNF e a deleção condicional do gene TrkB nessas células diminui sua proliferação e sobrevivência e suprime os efeitos dos antidepressivos sobre estes mesmos aspectos (BERGAMI *et al.*, 2008; LI *et al.*, 2008; SAIRANEN *et al.*, 2007). Isso demonstra que o BDNF medeia a estimulação da neurogênese causada pelos antidepressivos. Da mesma forma, a infusão central do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF, do inglês *Vascular Endothelial Growth Factor*) aumenta a proliferação celular e a sobrevivência de neurônios imaturos (JIN *et al.*, 2002; WARNER-SCHMIDT; DUMAN, 2007). Além disso, ratos *knockout* para VEGF possuem redução na proliferação celular no hipocampo (SUN *et al.*, 2006), enquanto que a superexpressão do VEGF mediada por vírus tem o efeito oposto (CAO *et al.*, 2004).

2.4.4.1.3. Mecanismo de ação das drogas que atuam no eixo HPA

São necessários dois eventos críticos para a regulação da homeostase em condições de estresse prolongado e, conseqüentemente, exposição exacerbada aos glicocorticoides: 1) A redução na capacidade de resposta dos receptores de glicocorticoides (RG) nas células granulares do hipocampo, levando à desinibição do eixo HPA e; 2) O aumento adicional da estimulação com corticosteroides (RAISON; MILLER, 2003). Os antidepressivos normalizam a função do eixo HPA, sendo que parte desse efeito envolve uma restauração da capacidade de resposta do RG. Este efeito é independente das ações de inibição na recaptção das monoaminas produzida pelos antidepressivos (ANACKER *et al.*, 2011a; OKUGAWA *et al.*, 1999). Estudos *in vitro* com células-tronco embrionárias demonstraram que os antidepressivos influenciam uma série de sistemas de sinalização intracelular e também inibem bombas presentes nas

membranas celulares, como, por exemplo, a glicoproteína de resistência múltipla a drogas (MDR-PGP) (YAU *et al.*, 2007). A inibição da MDR-PGP pelos antidepressivos aumenta o acesso dos glicocorticoides ao cérebro, aumentando as concentrações intracelulares de glicocorticoides (figura 14) e conduzindo, após alguns dias de tratamento, a um aumento na sensibilidade dos RG (CARVALHO; PARIANTE, 2008). O tratamento crônico com ISRSs aumenta a neurogênese *in vitro*, efeito que foi bloqueado por um antagonista de RG. Esses achados sugerem que a restauração da resposta de RG pelo tratamento antidepressivo crônico e sua estimulação subsequente por glicocorticoides pode ser crítica para a estimulação da neurogênese através dos antidepressivos. No entanto, há uma inconsistência entre esses achados *in vitro* e os efeitos dos antidepressivos *in vivo*, uma vez que as respostas *in vitro* são mediadas por um aumento nos níveis intracelulares de PKA (ANACKER *et al.*, 2011b) e *in vivo* os ISRSs aumentam a transmissão nos receptores 5HT_{1A}, o que diminui os níveis de PKA (POLTER; LI, 2010). Por conseguinte, a relevância para a sua ação terapêutica, que foi descrita em estudos *in vitro* com células-tronco embrionárias, não está clara. Alternativamente, essas ações podem ser relevantes, porém, em outras regiões cerebrais além do hipocampo, como o córtex pré-frontal (WILLNER; SCHEEL-KRÜGER; BELZUNG, 2013).

2.4.4.2. Resistência ao tratamento antidepressivo

Até 30% dos pacientes tratados com os antidepressivos atualmente disponíveis são refratários à terapia, apesar dos múltiplos esquemas terapêuticos empregados, e cerca de 50% daqueles que entram em remissão da doença recaem dentro de 6 a 12 meses (HOLTZHEIMER; MAYBERG, 2011; WARDEN *et al.*, 2007). Isto, paralelo à demora para início da ação antidepressiva, é o principal motivo para a necessidade de tratamentos aprimorados e contínuos. Num estudo clínico aberto, onde tanto o médico como o paciente possuem conhecimento sobre a medicação que está sendo administrada, sobre a eficácia das terapias antidepressivas, no teste de alternativas de tratamento sequenciado para aliviar a depressão (STAR*D), menos de um terço dos pacientes obteve remissão com um antidepressivo padrão após 14 semanas de tratamento. Respostas adicionais melhoradas foram obtidas após a prescrição de outro antidepressivo de classe distinta para os pacientes refratários. Mesmo após o tratamento com dois antidepressivos distintos e após 24 semanas de tratamento, apenas metade dos pacientes entraram em remissão (RUSH *et al.*, 2012; TRIVEDI *et al.*, 2006). A intransponibilidade deste problema levanta

a questão sobre a eficácia dos tratamentos antidepressivos ser intrinsecamente limitada. Isso sugere que se o evento-chave no início da depressão envolve um “registro” no córtex pré-frontal (quanto ao controle dos eventos adversos), os mecanismos que codificam os elementos dessa decisão podem não ser diferenciados neuroquimicamente de maneira que os tornem diferencialmente suscetível ao tratamento medicamentoso (WILLNER; SCHEEL-KRÜGER; BELZUNG, 2013). Felizmente, a evidência de que as depressões refratárias ao tratamento farmacológico respondem a ECT e a estimulação cerebral profunda (DBS, do inglês *Deep Brain Stimulation*) refuta essa perspectiva nihilista, ou seja, essa doutrina filosófica atual que atinge as mais variadas esferas do mundo contemporâneo com uma visão cética radical em relação às interpretações da realidade, que aniquila valores e convicções ao demonstrar que a resistência ao tratamento pode, de fato, ser superada.

2.5. Tratamento da ansiedade e depressão com plantas medicinais

O desenvolvimento de fármacos ansiolíticos e antidepressivos de origem vegetal envolve levantamento etnofarmacológico (investigação criteriosa da aplicação popular de medicamentos), estudos fitoquímicos e farmacológicos. A seleção de uma planta adequada para um estudo farmacológico é um passo muito importante. Os indícios relevantes para alcançar este passo incluem o uso tradicional, composição química, toxicidade, seleção aleatória ou uma combinação de vários critérios (FERRY; BALTASSAT-MILLET, 1997; WILLIAMSON; OKPAKO; EVANS, 1996). A seleção de plantas medicinais com vista à descoberta de novos agentes farmacêuticos com base na sua utilização popular é de longe a estratégia mais eficaz (ALBUQUERQUE; HANAZAKI, 2006).

Após o levantamento etnofarmacológico e estudos fitoquímicos, investigações biológicas são imprescindíveis. Modelos animais de ansiedade e depressão têm desempenhado papéis relevantes no desenvolvimento de novos fármacos (CRYAN; SWEENEY, 2011; OVERSTREET, 2012). Testes bem validados podem levar a achados pré-clínicos e clínicos consistentes de novos fármacos ansiolíticos e antidepressivos. Nos últimos tempos, algumas das abordagens pré-clínicas tradicionais corroboraram com otimizações e inovações nos modelos atuais. Para o desenvolvimento de novos tratamentos mais eficazes para os distúrbios do humor, são necessárias pesquisas que abordem o histórico dessas patologias, tratamentos farmacológicos, a investigação de

plantas medicinais com propriedades ansiolíticas e antidepressivas, bem como estratégias pré-clínicas para a investigação de extratos ou fitoconstituintes com estas atividades e suas possíveis toxicidades (FAJEMIROYE *et al.*, 2016).

Atualmente, o valor terapêutico das plantas medicinais reflete do percentual de prescrições médicas com base na fitoterapia, das quais 25% são derivadas de alguma espécie específica (DUKE, 1993). Em todo o mundo, a medicina tradicional representa a principal forma de cuidados de saúde ou complemento a ela (WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION), 2014). Em alguns países, esse tipo de terapia pode ser denominada de medicina complementar e alternativa, sendo uma parte importante de suporte ao tratamento às patologias e, muitas vezes, subestimada nos serviços de saúde (HORNIK-LURIE *et al.*, 2013). A medicina tradicional é a soma total de conhecimentos, habilidades e práticas culturais baseadas em teorias, crenças e experiências indígenas, explicáveis ou não ao diagnóstico e ao tratamento das doenças físicas e mentais (DIAS; URBAN; ROESSNER, 2012).

Atualmente, há uma dependência muito acentuada das bases farmacológicas para terapêutica de distúrbios mentais, ou seja, uma necessidade da utilização de drogas sintéticas para curar ou aliviar certos transtornos emocionais. Enquanto isso, pesquisas têm demonstrado que muitas pessoas procuram produtos naturais, à base de plantas para o tratamento de diferentes tipos de transtornos psiquiátricos. Nos últimos tempos, as pesquisas estão sendo focadas na validação de plantas medicinais popularmente conhecidas por suas propriedades psicoativas. Compostos importantes que agem sobre o SNC foram isolados de diferentes espécies de plantas e, alguns deles, atualmente vem sendo utilizados na clínica (na sua forma natural ou modificada) para vários distúrbios psiquiátricos (FAJEMIROYE *et al.*, 2016).

Estudos têm demonstrado que muitos constituintes fitoquímicos, como saponinas (DANG *et al.*, 2009), alcalóides (LI *et al.*, 2013; LIU *et al.*, 2013), polifenóis (SASAKI *et al.*, 2013), triterpenóides (MACHADO *et al.*, 2012), óleos essenciais (GALDINO *et al.*, 2012; OYEMITAN *et al.*, 2013), ácidos graxos (SHRI; BHUTANI; SHARMA, 2010) e flavonoides (KUMAR; BHAT, 2014) possuem efeitos antidepressivos. Nesse contexto, vale destacar a descoberta de novos fármacos com atividades ansiolíticas e antidepressivas. Durante os anos de 1981 a 2002, dez novos compostos químicos com atividade ansiolítica e 21 com atividade antidepressiva foram desenvolvidos a partir de plantas e, posteriormente, sintetizadas (NEWMAN; CRAGG; SNADER, 2003).

Os órgãos reguladores definem medicamentos fitoterápicos como aqueles obtidos com uso exclusivo de plantas com eficácia reconhecida, nível aceitável de segurança, dados científicos, estudos pré-clínicos (farmacológicos e toxicológicos) e publicações clínicas (ANVISA, 2014; EMA, 2015).

2.6. Toxicologia: a qualidade metodológica dos estudos

Apesar dos grandes avanços científicos realizados no campo da biologia molecular, biotecnologia e bioinformática, os conceitos básicos de toxicologia regulatória dificilmente foram melhorados e/ou alterados nas últimas décadas. A publicação da “*National Academy of Sciences*” e do relatório do “*National Research Council*” “Testes de Toxicidade no Século XXI: Uma Visão e uma Estratégia” (NRC (NATIONAL RESEARCH COUNCIL), 2007) colaboraram para o desenvolvimento de uma ampla discussão sobre a necessidade de mudanças de paradigmas no campo da toxicologia para implementar os últimos avanços das ciências da saúde como um todo (VAN VLIET, 2011). Um dos principais problemas discutidos neste relatório foi os requisitos necessários para extrapolar de ensaios celulares *in vitro* para efeitos agudos e crônicos *in vivo* sobre a saúde em modelos animais (ANDERSEN *et al.*, 2010; ANDERSEN; KREWSKI, 2010).

Estudos *in vivo* avaliam os efeitos de determinado tratamento sobre os animais vivos, enquanto que os estudos *in vitro* avaliam os efeitos desses efeitos sobre biomoléculas, células ou tecidos, de animais ou seres humanos. Os estudos de relação estrutura-atividade (SARs, do inglês *Structure-Activity Relationships*) são abordagens que relacionam as propriedades físico-químicas de um fármaco e a sua estrutura molecular com um efeito biológico, por exemplo, toxicidade. Estudos de propriedades físico-químicas investigam, por exemplo, o coeficiente de partição octanol-água de um determinado composto, fornecendo informações que podem orientar os testes de toxicidade subsequentes. Estudos de observação humana podem explorar a relação entre a exposição humana a um agente ambiental e um efeito sobre a saúde. A partir disso, vários tipos de estudos podem ser desenvolvidos, como, por exemplo, caso-controle, estudos de coorte, estudos transversais, entre outros (SAMUEL *et al.*, 2016).

Pesquisas não clínicas de segurança com qualidade são de suma importância para condução dos ensaios de toxicidade durante o desenvolvimento de medicamentos. A tabela 4 demonstra as principais pesquisas *in vitro* e *in vivo* no campo da toxicologia

voltadas para o desenvolvimento da qualidade metodológica e reforça a ideia de que novas pesquisas devem continuar sendo efetuadas com maior desempenho, confiabilidade e, conseqüentemente, gerando resultados fidedignos quanto à segurança, seja no consumo de medicamentos ou de alimentos.

Tabela 4. Principais pesquisas *in vitro* e *in vivo* dirigidas para qualidade metodológica no campo da toxicologia.

Referência	Síntese e resultados da pesquisa
Pesquisas com foco estrito na qualidade metodológica	
<p>HOBBS; WARNE; MARKICH, 2005</p>	<p>Esta pesquisa apresenta os resultados de um experimento realizado por avaliadores de artigos para melhorar o esquema de avaliação de qualidade da base de dados de ecotoxicidade australiana para dados de toxicidade aquática. O esquema consistiu em 20 questões, que foram aplicadas de forma independente por 23 ecotoxicologistas em dois trabalhos de pesquisa. Como resultado, foram propostos critérios refinados, levando, conseqüentemente, à avaliações mais consistentes. Os principais critérios propostos foram: 1) Duração da exposição à substância teste; 2) Descrição do efeito biológico; 3) Uso de controles apropriados; 4) Descrição dos critérios de aceitação do teste e; 5) Tipo de modelo estatístico utilizado. A cada critério é atribuído a uma pontuação somando-se, ao final, o escore cumulativo. Em seguida, um resultado geral é obtido e usado para caracterizar a qualidade dos dados como "inaceitável" ($\leq 50\%$), "aceitável" (51 a 79%) ou "alta" ($\geq 80\%$).</p>
<p>HULZEBOS <i>et al.</i>, 2010</p>	<p>A pesquisa propôs um Sistema Integrado de Avaliação para avaliar a adequação global dos dados de toxicologia no cumprimento dos requisitos das informações no sistema de gestão de produtos químicos da União Europeia (UE). O sistema proposto compreende três módulos: 1) A "confiabilidade" dos dados; 2) A validade do método utilizado e; 3) A necessidade regulatória dos dados. Os princípios de validação da OECD foram utilizados para fornecer um conjunto harmonizado de critérios para avaliar os três módulos. Categorias de avaliação são atribuídas à informação avaliada, de modo que existem quatro categorias possíveis em cada um dos três módulos. Os códigos de confiabilidade são: R1 = "Confiável sem restrições"; R2 = "Confiável com restrição"; R3 = "Não confiável" e; R4 = "Não atribuível". Um raciocínio similar para a classificação aplica-se aos dois módulos restantes, resultando em códigos de validade (V1 a V4) e códigos de necessidade regulatórios (N1 a N4). As várias combinações dos três módulos (por exemplo, R1-V2-N4) são atribuídas a três conclusões de adequação de dados: "adequado", "parcialmente adequado" e "inadequado".</p>
<p>ROONEY <i>et al.</i>, 2014</p>	<p>A pesquisa desenvolveu um quadro de sete etapas para a revisão sistemática de questões de saúde ambiental para tirar conclusões de identificação de perigos. As sete etapas são: 1) Formular o problema; 2) Desenvolver o protocolo; 3) Pesquisar e selecionar os estudos para inclusão; 4) Extrair dados dos estudos; 5) Avaliar a qualidade ou o risco de viés dos estudos individuais; 4) Avaliar a confiança das evidências achadas; 6) Traduzir as classificações de confiança em níveis de evidência para um efeito sobre a saúde e; 7) Integrar a evidência para desenvolver conclusões de identificação de perigos.</p>

Pesquisas com foco ampliado

COECKE *et al.*,
2005

Este artigo propõe melhores práticas em todos os aspectos quanto ao uso de células e tecidos *in vitro*. A orientação proposta sobre boas práticas de cultura de células fornece padrões para qualquer trabalho envolvendo culturas de células e tecidos, incluindo a preparação de células e tecidos derivados de humanos e animais, manutenção de características importantes, garantia da qualidade, registros e relatórios e formação e ética. As diretrizes são aplicáveis aos testes *in vitro* utilizados para satisfazer os requisitos regulamentares para compostos químicos.

UNGER, 2007

Este artigo fornece recomendações para melhorar a confiabilidade e a capacidade preditiva da pesquisa pré-clínica. De acordo com o autor, a variabilidade e o viés são os principais desafios na concepção, realização e análise de estudos pré-clínicos na pesquisa translacional. As recomendações para minimizar a variabilidade incluem: 1) A utilização de amostragem adequadamente suficiente para superar a variabilidade no modelo; 2) O uso de animais isentos de doenças, de idades aproximadas e de uma única fonte e; 3) O cuidado e manejo adequados dos animais em todos os grupos experimentais. As recomendações para superar vieses na concepção e análise da pesquisa incluem: 1) Randomização adequada; 2) Plano prospectivo para gerenciar dados faltantes e/ou extremos; 3) Uso de abordagens estatísticas rigorosas; 4) Descrição das limitações do estudo e; 5) A fundamentação dos achados.

HOOIJMANS *et al.*, 2014

O Centro de Revisão Sistemática para Experimentação com Animais de Laboratório desenvolveu uma ferramenta para avaliação de riscos de viés em estudos com intervenção animal. A ferramenta compreende 10 itens que avaliam seis diferentes tipos de viés: 1) Viés de seleção (a sequência de alocação de animais foi gerada e aplicada de forma adequada?); 2) Viés de desempenho (os animais foram alojados aleatoriamente durante a experiência?); 3) Viés de detecção (os animais foram selecionados aleatoriamente para a avaliação de resultados?); 4) Viés de atribuição (os resultados incompletos foram adequadamente abordados?); 5) Viés de artigo (o estudo relata resultados não-seletivos?) e; 6) Outros vieses (O estudo foi, aparentemente, livre de outros problemas que possam resultar em alto risco de viés?).

VAN LUIJK *et al.*,
2014

No contexto da melhoria da tradução dos dados obtidos em pesquisas com animais para a prática clínica, os autores analisaram o risco de viés em revisões sistemáticas recentes de estudos pré-clínicos em animais, bem como o risco real de parcialidade dos estudos primários incluídos nessas análises. Trinta e três avaliações sistemáticas e seus estudos primários associados foram avaliados. O risco de viés foi focado nos seguintes itens (com o viés correspondente entre parênteses): 1) Design de estudo randomizado (viés de seleção); 2) Aleatoriedade do investigador no processo de alojamento dos animais (viés de desempenho); 3) Imparcialidade na avaliação de resultados (viés de detecção) e; 4) Resultados incompletos (viés de atribuição). Os estudos primários obtiveram resultados baixos (menos de 25%) em cada um desses quatro elementos, levando à conclusão de que a qualidade metodológica dos estudos primários em animais deve ser melhorada.

Finalmente, os estudos supracitados têm aplicabilidade a muitos aspectos da toxicologia. Uma maior atenção à qualidade metodológica e, conseqüentemente, dos

artigos publicados utilizando as ferramentas dos estudos toxicologicamente relevantes possuem potencial para melhorar a ciência da toxicologia e as tomadas de decisão quanto aos resultados obtidos nas pesquisas, bem como incentivar o investimento financeiro racional e mais eficiente em pesquisas e o uso de animais na experimentação (SAMUEL *et al.*, 2016).

2.6.1. Conceitos básicos em toxicologia

2.6.1.1. Frequência e duração da exposição

A frequência de exposição refere-se ao número de vezes que um indivíduo está exposto e ao tempo entre as exposições a uma determinada substância. A duração da exposição pode ser aguda, subcrônica ou crônica. A exposição aguda refere-se a uma ou duas exposições em um curto período de tempo (uma semana ou menos). A exposição crônica refere-se ao longo prazo ou a exposição ao longo da vida e abrange pelo menos 10% da vida de um indivíduo. Para os seres humanos, isso é considerado sete anos ou mais. A exposição subcrônica compreende o tempo entre a aguda e crônica, e se estende de mais de uma semana para menos de 7 anos (GOODMAN, 1998). Existe uma diferença no tipo e gravidade dos efeitos, dependendo da rapidez (duração) e frequência com que a dose é recebida (UNL (ENVIRONMENTAL HEALTH AND SAFETY), 2002).

A exposição cumulativa refere-se à exposição passada e/ou presente de uma entidade a múltiplos estressores ambientais que ocorrem por todas as rotas, caminhos e fontes pertinentes. A exposição aos constituintes de uma determinada mistura não precisa, necessariamente, ser contemporânea para produzir impactos cumulativos, portanto, é vital ter consciência de como a presença ou a persistência desses estressores múltiplos (ou suas consequências) contribuem para a série de eventos biológicos que causam os efeitos adversos. A avaliação cumulativa da exposição é a avaliação da exposição simultânea, sobreposta e sequencial a múltiplos estressores ambientais que podem contribuir para resultados prejudiciais. Uma grande motivação para realizar avaliações de exposição cumulativa é contribuir para a determinação da exposição diferencial entre os indivíduos, comunidades ou populações, bem como determinar a maior vulnerabilidade aos agentes tóxicos (figura 15). A exposição diferencial refere-se a diferenças na magnitude, duração, frequência ou tempo de exposição, bem como diferenças em níveis de exposição

pregressa e concentrações corporais relacionadas que podem afetar a probabilidade, a natureza e a gravidade dos efeitos adversos. O termo "vulnerabilidade" é utilizado para demonstrar a propensão intrínseca de um indivíduo exposto de experimentar efeitos adversos de agentes externos, eventos, perturbações ou estresses (EPA (ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY), 2003).

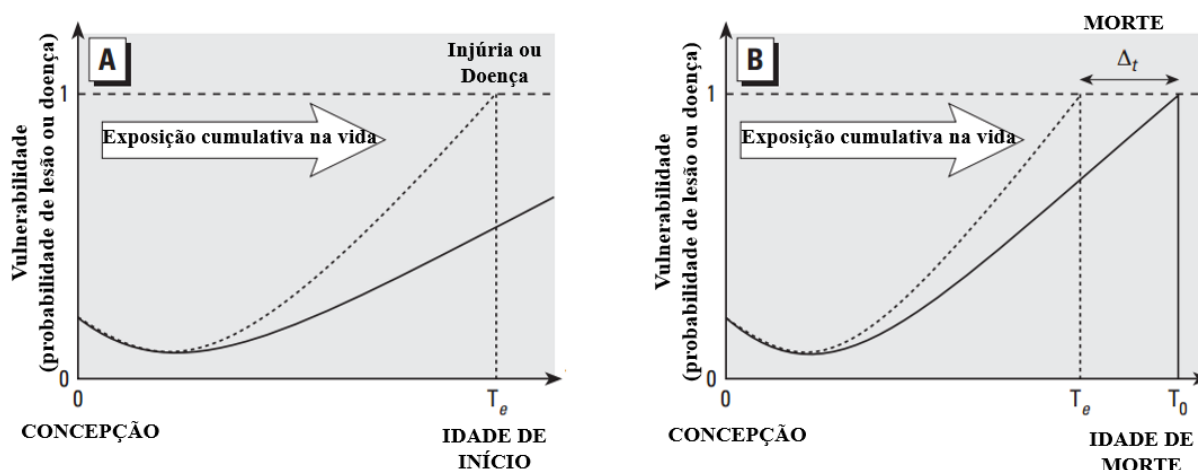


Figura 15. Representação esquemática de possíveis efeitos da exposição cumulativa diferencial ao longo da vida.

A) Exposição cumulativa e morbidade e; B) Exposição cumulativa e mortalidade. Abreviações: Δ_t , diferença de tempo na idade da morte; T_e , idade no início da injúria ou doença; T_0 , idade na morte. FONTE: Adaptado de NRC, 2002.

2.6.1.2. Rotas de exposição

Para os seres humanos, existem três vias principais de exposição aos agentes tóxicos: 1) A via inalatória (através da respiração); 2) A via oral (através da ingestão de comidas ou bebidas); e; 3) A via dérmica (através da pele) (GOODMAN, 1998; STELLJES, 2000). A exposição à inalação pode ser aguda através da respiração de determinado produto durante o uso a curto prazo ou crônica, a partir da inalação de produtos químicos por tempo prolongado em ambientes internos. A exposição oral pode ser direta (comer ou beber determinado agente tóxico) ou indireta, através do contato entre a mão e a boca depois de tocar um produto químico. Também pode ser aguda ou crônica. A exposição dérmica é geralmente de curto prazo e ocorre através de respingos ou derramamento do agente tóxico durante o uso ou ainda a partir do contato com superfícies contaminadas. Pode resultar em danos à pele ou absorção sistêmica. A

exposição dérmica também pode ser crônica se ocorrer repetidamente durante um longo período de tempo. Uma pequena rota de exposição é a via ocular (através dos olhos) (DICKY, 2001; STELLJES, 2000). A exposição ocular, da mesma forma, geralmente é de curto prazo e resulta de respingos ou derramamento do agente tóxico durante o seu uso ou através do contato das mãos contaminadas com os olhos (DICKY, 2001).

Os resultados biológicos podem ser distintos para a mesma dose do agente tóxico, dependendo da via pela qual ele é introduzido no organismo, isto é, se o composto foi inalado, ingerido, aplicado à pele ou injetado. As barreiras naturais do organismo impedem a absorção e distribuição de determinadas substâncias. Essas barreiras podem atenuar os efeitos tóxicos independentemente da concentração da dose. No entanto, a eficácia dessas barreiras é parcialmente dependente da via de administração do agente tóxico. Uma vez que o composto é absorvido pelo organismo, três outros processos provavelmente ocorrerão: 1) A biotransformação; 2) O armazenamento e; 3) A excreção. Muitos agentes tóxicos são metabolizados ou biotransformados através de reações químicas mediadas por enzimas no organismo. Em alguns casos, os agentes tóxicos químicos são distribuídos e armazenados em órgãos específicos. O armazenamento pode reduzir a biotransformação e, portanto, aumentar o tempo de permanência do agente no organismo. Os vários mecanismos excretores do organismo (respiração, transpiração, urina, fezes ou desintoxicação) tendem a eliminação irreversível do composto. Para a eliminação de alguns compostos químicos o tempo pode variar em questão de dias ou meses. No entanto, para outros, a taxa de eliminação é tão baixa que pode persistir no corpo durante toda a vida e causar efeitos deletérios (UNL (ENVIRONMENTAL HEALTH AND SAFETY), 2002)

2.6.1.3. Efeitos deletérios sobre a saúde

Os efeitos deletérios comuns da exposição à agentes tóxicos incluem a capacidade de indução de câncer (carcinogenicidade), efeitos sobre os sistemas orgânicos como um todo, efeitos reprodutivos e efeitos sobre o desenvolvimento fetal. Doenças como o câncer de pulmão, de pele, leucemia, câncer de mama e de próstata foram todos associados à exposição à agentes tóxicos. Os efeitos reprodutivos envolvem a redução ou perda de fertilidade. Os efeitos do desenvolvimento são aqueles que levam à morte do feto (fetotoxicidade) ou aqueles que causam defeitos congênitos (teratogenicidade). Os órgãos que frequentemente são alvo de agentes tóxicos incluem o fígado, os rins e o sistema

nervoso (STELLJES, 2000). Outros efeitos importantes para a saúde incluem comprometimento do sistema imunológico, dano genético (mutagenicidade) e inibição da capacidade do organismo de eliminar esses agentes (PONCE, 2001).

Apesar dos consideráveis esforços e investimentos financeiros dedicados à pesquisa sobre o câncer nos últimos tempos, ainda não foi possível derrotá-lo e continua sendo uma doença letal. O câncer é a segunda principal causa de morte nos países ocidentais, logo após as doenças cardiovasculares (FRANKISH, 2003). Contrariamente à imagem difundida pela maioria dos grupos de pesquisa que se concentram principalmente em estudos genéticos, as causas do câncer são predominantemente de natureza ambiental (isto inclui exposição a agentes tóxicos, estilo de vida, dieta e trabalho). Além disso, pesquisas estimaram que cerca de 80% dos cânceres possuem um forte componente ambiental envolvido (BENIGNI, 2007; TOMATIS *et al.*, 1997). Sendo assim, o estudo dos mecanismos da carcinogênese induzida por agentes tóxicos e o delineamento de estratégias e medidas de prevenção eficientes são de importância crucial para a proteção e segurança da saúde humana (BELPOMME *et al.*, 2007; BENIGNI; BOSSA, 2011).

Os distúrbios da reprodução e os riscos para a saúde reprodutiva tornaram-se importantes problemas de saúde pública. Vários fatores estão associados a distúrbios do sistema reprodutivo, incluindo a dieta, o meio ambiente, o *status* socioeconômico, o estilo de vida e o estresse. Os distúrbios da reprodução em seres humanos incluem, mas não estão limitados a: 1) Redução da fertilidade; 2) Impotência; 3) Distúrbios menstruais; 4) Aborto espontâneo; 5) Baixo peso ao nascer e outros defeitos de desenvolvimento (incluindo hereditários); 6) Senescência reprodutiva prematura e; 7) Várias doenças genéticas que afetam o sistema reprodutivo e a prole. A prevalência da infertilidade, que é definida clinicamente como a incapacidade de conceber após um ano de relações sexuais desprotegidas, é difícil de estimar (EPA (ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY), 1996).

2.6.1.4. Medidas em toxicologia

Em toxicologia, dose é o quanto um indivíduo é exposto a um determinado agente potencialmente tóxico e, geralmente, é medida em miligramas por quilo (mg/kg), ou miligramas por litro (mg/L), onde “mg” é a quantidade do agente tóxico presente e kg refere-se ao peso da pessoa ou do animal exposto e L corresponde a um litro de ar

(DICKY, 2001). A toxicidade dos produtos químicos é geralmente medida usando a DL_{50} (dose letal) ou CL_{50} (concentração letal). A DL_{50} e a CL_{50} referem-se à dose que produz a morte na metade dos animais que foram submetidos ao teste (geralmente ratos e camundongos). Tanto a DL_{50} como a CL_{50} demasiadamente altas implica, necessariamente, numa menor toxicidade, visto que é necessária maior concentração do agente tóxico para resultar em morte. Uma baixa DL_{50} ou CL_{50} implica uma maior toxicidade, ou seja, apenas uma pequena concentração do agente induz a morte de 50% da população que está sendo estudada. Ambas, DL_{50} e CL_{50} , medem os efeitos agudos e, portanto, não fornecem informações sobre o desenvolvimento de efeitos crônicos de um determinado composto sobre a saúde do indivíduo. Por exemplo, a DL_{50} do chumbo não é particularmente importante, dado os seus efeitos adversos sobre o desenvolvimento do sistema nervoso mesmo em níveis muito baixos de exposição. A DL_{50} pode ser facilmente mal interpretada se utilizada como única característica de toxicidade de uma substância. O ácido acetilsalicílico é um medicamento de uso geral utilizado em excesso, enquanto que o diclorodifeniltricloroetano (DDT) é um pesticida que foi banido por causa de seus efeitos tóxicos e persistência no meio ambiente. No entanto, eles possuem DL_{50} semelhantes (GILBERT, 2012).

Um viés da utilização da DL_{50} e CL_{50} como uma medida de toxicidade nas pesquisas é que, quando os pesquisadores as calculam ou estimam, geralmente, o fazem com base na exposição a apenas um agente tóxico, porém, na vida cotidiana, as pessoas não estão expostas a apenas um agente (GILBERT, 2001).

Atualmente, a DL_{50} não é mais reconhecida como uma avaliação adequada ou mesmo útil da capacidade de um agente tóxico causar danos. Os toxicologistas desenvolveram uma ampla gama de testes para determinar se um agente pode produzir um efeito adverso em todos os sistemas orgânicos. Caso sejam observados efeitos adversos, testes adicionais devem ser realizados para caracterizar e compreender cuidadosamente o dano. É importante ressaltar que o perigo deve ser analisado sob a ótica da variabilidade e sensibilidade interindividual (GILBERT, 2012).

2.6.2. Estudo da toxicidade oral aguda

Com relação a toxicidade aguda deve-se considerar todas as informações disponíveis sobre a substância (ou planta) a ser testada. Tais informações incluem as identidades e estruturas químicas dos compostos, suas propriedades físico-químicas e os

resultados de quaisquer outros testes de toxicidade *in vitro* ou *in vivo*. Estas informações serão úteis para determinar a relevância do teste para a proteção da saúde humana e do meio ambiente e ajudará na seleção de uma dose inicial apropriada para o estudo (OECD, 2008a).

Testes agudos de toxicidade sistêmica são necessários para fornecer informações sobre os efeitos adversos à saúde que possam surgir após a exposição a curto prazo a um composto químico por uma via específica (oral, dérmica ou inalatória). Para muitas substâncias químicas, a via mais provável que leva à exposição sistêmica significativa é a oral. Esta exposição pode ser acidental ou deliberada e pode ocorrer em locais de trabalho ou mesmo em casa. As principais maneiras pela qual um indivíduo entra em contato com o agente tóxico são: 1) A ingestões inadvertidas após respingos inesperados ou liberação repentina e; 2) Através do consumo de produtos químicos presentes nos alimentos, bebidas ou outros produtos, como aqueles usados para os cuidados pessoais. Os dados de toxicidade oral aguda representam um dos critérios comuns por muitas agências reguladoras em todo o mundo para fornecer as devidas advertências e classificações das possíveis consequências da exposição oral a um determinado produto químico (CRETON *et al.*, 2010).

O teste de toxicidade oral aguda foi desenvolvido para identificar a dose média capaz de induzir a morte de metade dos animais do grupo teste (DL₅₀ como discutido anteriormente) após uma única dose (ou doses múltiplas dentro de um período de 24 horas) possibilitando uma comparação estimativa pontual numérica entre as substâncias e permitindo a classificação da substância teste quanto à sua potência. Em 1981, o teste DL₅₀ foi modificado para reduzir o número de animais necessários, sendo desenvolvido um novo *guideline* (compreendido daqui em diante como uma diretriz) pela OCDE, o *guideline* “Nº 401” (OECD, 1987). Na nova diretriz, três grupos compostos por pelo menos 5 animais de cada sexo devem ser selecionados para identificar a DL₅₀. Um limite de dose superior de 5000 mg/kg também foi introduzido nesta nova diretriz para limitar o uso desnecessário de animais. Um refinamento adicional do método foi realizado em 1987 e permitiu o uso de um único gênero e a redução da dose limite para 2000 mg/kg, salvo que hajam necessidades justificáveis de modificação (CRETON *et al.*, 2010).

Logo após a implementação do *guideline* pela OCDE em 1981, um grupo de trabalho da Sociedade Britânica de Toxicologia (BTS, do inglês *British Toxicology Society*) propôs um novo método para avaliar a toxicidade oral aguda que utilizava um número ainda menor de animais e evitava a morte como ponto final, inserindo dados de

observações de sinais clínicos evidentes de toxicidade para fornecer uma estimativa de alcance da DL_{50} (BTS (BRITISH TOXICOLOGY SOCIETY), 1984). O método proposto foi validado com o objetivo de classificar os compostos de acordo com o sistema de classificação Europeu (VAN DEN HEUVEL *et al.*, 1990). A nova diretriz foi denominada de Procedimento de dose fixa (FDP, do inglês *Fixed Dose Procedure*; OECD *guideline* 420) e foi adotada em 1992 tornando-se o padrão-ouro estimativa da DL_{50} . Posteriormente, foram adotados dois outros métodos que também reduziam, substancialmente, o número de animais: 1) A Classe Tóxica Aguda (ATC, do inglês *Acute Toxic Class*; *guideline* 423) e; 2) O Procedimento “Up-and-Down” (UDP, do inglês “*Up-and-Down*” *Procedure*; *guideline* 425), sendo este último, o modelo escolhido na avaliação da toxicidade aguda na presente tese (OECD, 2001a, 2001b, 2008a). A maioria dos testes utilizando a metodologia FDP são completados utilizando de 5 a 7 animais, enquanto o método ATC utiliza em média 7 animais e o UDP cerca de 6 a 10 animais. Ambos os últimos dois métodos utilizam a morte, seja ela iminente ou não, como um ponto final para estimar a DL_{50} . O *guideline* 401 da OCDE foi excluído em 2002. O resultado foi que, desde a década de 1970, o número de animais utilizados nos testes de toxicidade aguda diminuiu drasticamente de aproximadamente 100/teste para 5 a 10/teste (OECD, 2001c).

Embora os dados obtidos a partir dos testes de toxicidade oral aguda preconizados pelas diretrizes sejam de muito valor para a identificação de perigos e, portanto, a classificação dos compostos químicos, raramente são inclusos efeitos sobre órgãos-alvo, mecanismo de ação ou dados toxicocinéticos, limitando a utilidade dos dados obtidos para outros fins (CRETON *et al.*, 2010).

A classificação de perigo para a toxicidade oral aguda é conduzida pela estimativa da DL_{50} (como discutido anteriormente) ou é baseada na dose que produz a toxicidade evidente, isto é, sinais claros de aumento de toxicidade após a administração da substância de teste, de tal forma que a dose superior (ou doses próximas a ela) resultarão no desenvolvimento de graves sinais de toxicidade e provavelmente mortalidade (OECD, 2001c). Os métodos ATC e UDP empregam a morte, iminente ou não, como ponto final do estudo de toxicidade. Os animais que estão gravemente doentes ou obviamente com dor e que demonstram sinais de sofrimento severo e duradouro devem ser eutanasiados, conforme descrito na diretriz da OCDE sobre a eutanásia de animais considerados como mortos a partir do tratamento empregado no estudo (OECD, 2000).

O FDP emprega sinais evidentes de toxicidade clínica e não necessariamente morte ponto final. A partir disto, surge uma análise realizada durante o estudo sobre quais sinais clínicos de toxicidade, ou combinação destes sinais, podem ser considerados "evidentes". Isso requer mais habilidade e experiência, mas é eminentemente realizável. O ponto final não-letal também tem a vantagem de permitir que informações sobre a recuperação da toxicidade sejam clinicamente manifestas. Em algumas regiões, a metodologia FDP é menos utilizada do que a ATC devido à maior incerteza associada à identificação de sinais clínicos evidentes de toxicidade em vez de morte. Além disso, é receoso que o uso do ponto final não-letal possa resultar em uma superestimação da toxicidade puramente baseada nos sinais clínicos. No entanto, a informação sobre as doses que induzem toxicidade, e não as que causam a morte, provavelmente será de maior valor na avaliação e gerenciamento do risco, corroborando com a predição, prevenção, reconhecimento e tratamento dos sintomas em casos de intoxicação aguda em humanos (CRETON *et al.*, 2010).

Além disso, várias orientações regulatórias, incluindo a diretiva Europeia sobre a utilização de animais para fins experimentais e outros fins científicos, exigem que, quando o teste em animais é necessário, o método que incorre em menor gravidade deve ser selecionado (EEC, 1986).

2.6.3. Estudo da toxicidade oral de doses repetidas

Nos estudos de toxicidade oral por doses repetidas (toxicidade a curto prazo) a determinação do potencial tóxico subcrônico deve ser realizado após informações iniciais obtidas nos testes de toxicidade aguda. Este tipo de estudo destina-se a investigar uma ampla variedade de possíveis alvos de toxicidade, além de fornecer informações sobre os possíveis riscos para a saúde que possam surgir durante ou após um período de exposição repetida limitada, incluindo efeitos sobre o sistema nervoso central, imunológico, endócrino e reprodutivo masculino e feminino (ANVISA, 2013; OECD, 2008b).

Atualmente, o termo toxicidade vem sendo empregado para descrever o potencial que um determinado composto químico possui de induzir um estado patológico subsequentemente à sua introdução no organismo. Dados como dosagem, sinais clínicos, mudanças em hábitos fisiológicos, alterações bioquímicas, hematológicas e histopatológicas serão utilizadas para determinar tal potencial de toxicidade; tal análise minuciosa é denominada de avaliação toxicológica.

Os estudos de toxicidade oral de doses repetidas são utilizados para a obtenção de informações sobre a toxicidade de substâncias químicas através de múltiplas exposições. Tais estudos podem durar de 28 a 90 dias e são determinados os níveis nos quais não são observados efeitos tóxicos, a identificação e caracterização dos órgãos afetados, a gravidade após a exposição repetida e a reversão dos efeitos tóxicos. A via de administração deve ser aquela pretendida para o uso ou de provável exposição (OGA; CAMARGO; BASTIUZZO, 2008).

Inúmeros trabalhos envolvendo ensaios pré-clínicos *in vivo* de produtos naturais, utilizam parâmetros bioquímicos, hematológicos e anatomopatológicos para avaliar possíveis sinais de toxicidade, como preconizado pelas agências reguladoras. Nestes estudos, após a exposição às drogas, são analisados parâmetros que avaliam possíveis alterações metabólicas em geral, disfunção hepática e renal, bem como nos parâmetros hematológicos e histopatológicos. A análise histopatológica (macro e microscópicas) são de fundamental importância, pois avaliam estrutura e função, em nível celular. Portanto, torna-se evidente a necessidade e importância da avaliação desses parâmetros para detectar possível toxicidade de qualquer composto analisado (PITA, 2011).

O modelo de ensaio de toxicidade a curto prazo estudado na presente tese foi a toxicidade oral a curto prazo por 28 dias. O princípio deste ensaio consiste na administração da substância teste por via oral diariamente em doses graduadas a vários animais subdivididos em grupos experimentais. Cada grupo recebe uma dose distinta dos demais por um período de 28 dias. Durante a fase de administração, os animais são avaliados quanto a possíveis sinais de toxicidade. Os animais que morrem ou são eutanasiados durante o teste são necropsiados e, ao final dos experimentos, os animais que sobrevivem são eutanasiados e necropsiados. Um estudo de 28 dias fornece informações sobre os efeitos da exposição oral repetida e pode indicar a necessidade de novos estudos a longo prazo. Também pode fornecer informações sobre a determinação de doses para os estudos de toxicidade crônica. Os dados observados neste tipo de estudo devem permitir: 1) A caracterização da toxicidade da substância de teste; 2) A indicação da relação dose-resposta e; 3) A determinação da Dose de Efeitos Adversos Não Observáveis ou dose NOAEL (do inglês, *No-Observed Adverse Effect Level*) (OECD, 2008b).

Geralmente, ocorre uma discordância quanto à definição de termos comuns utilizados na avaliação de risco, bem como inconsistências na aplicação de termos a NOAEL dose. (Filipsson e colaboradores (2003) e Lewis e colaboradores (2002)

demonstraram que a NOAEL dose é um valor medido/estimado e pode ser diferente do verdadeiro nível de dose que provoca efeitos adversos, que, geralmente, situa-se entre a NOAEL e a menor dose com efeito adverso observável (ou LOAEL dose, do inglês *Lowest-Observed-Adverse Effect-Level*).

Calabrese e Baldwin (2003) e Calabrese e colaboradores (1999) introduziram uma discussão sobre compostos químicos que possuem efeitos opostos em doses altas e em doses baixas (hormese) na avaliação da NOAEL dose. Em uma resposta hormonal, a estimulação de efeitos biológicos ocorre abaixo do limiar de toxicidade enquanto uma inibição ocorre acima do limiar. Corrobora com isto, o fato de que grupos tratados com doses baixas desses hormônios demonstram melhores efeitos em relação ao grupo controle. Isso pode estar relacionado a uma resposta homeostática adaptativa ou exagerada. Esta resposta também pode pertencer a uma gama de efeitos oriundos da farmacodinâmica do composto que ocorreriam no intervalo de dose abaixo da NOAEL, como o observado com hormônios e medicamentos similares a estes.

Devido aos requisitos regulatórios, a maioria dos estudos de toxicologia que ocorrem durante o desenvolvimento de potenciais novos medicamentos são realizados com doses muito superiores às baixas onde, provavelmente, ocorra a hormese. É improvável que o uso de dados sobre hormese substitua o método tradicional de se estabelecer a NOAEL dose até que haja uma melhor compreensão da sua contribuição na avaliação de risco (RODRICKS, 2003). De fato, a falta de significância estatística por si só não é suficiente para a determinação da NOAEL dose. Em vez disso, ela deve ser determinada através da análise combinada dos efeitos biológicos e estatísticos (DORATO; ENGELHARDT, 2005).

2.6.4. Genotoxicidade e mutagenicidade

Atualmente, os estudos de genotoxicidade têm utilizado o ensaio do cometa sob condição alcalina (daqui em diante chamado apenas de ensaio do cometa) e o teste do micronúcleo. O ensaio do cometa é uma técnica eletroforética sensível, reprodutível, simples e rápida para detecção de rupturas nas cadeias do ácido desoxirribonucleico (DNA) em células ou núcleos isolados de múltiplos tecidos animais (geralmente roedores) que foram expostos a substâncias potencialmente genotóxicas (OECD, 2016a). Já o teste do micronúcleo, é utilizado para detecção de danos induzidos por determinada substância nos cromossomos ou aparelho mitótico dos eritroblastos (OECD, 2016b).

A genotoxicidade é uma palavra usada na genética para descrever a capacidade de uma substância de induzir efeitos nocivos/destrutivos sobre o material genético da célula (DNA e ácido ribonucleico (RNA)), afetando assim a integridade celular. As genotoxinas mutagênicas são substâncias que podem causar genotoxicidade provocando danos ao DNA ou material cromossômico, causando mutação. As genotoxinas podem ser compostos químicos sintéticos ou de origem natural, como, por exemplo, os fitoconstituintes e as radiações. A toxicologia genética é o ramo da ciência que trata do estudo de agentes ou substâncias que podem danificar o DNA e os cromossomos da célula. Note-se que, muitas vezes, a genotoxicidade é confundida com a mutagenicidade. Todas as substâncias mutagênicas são genotóxicas, no entanto, nem todas as substâncias genotóxicas são mutagênicas (DE FLORA; IZZOTTI, 2007). As genotoxinas podem ser classificadas de acordo com os seus efeitos em: 1) Carcinogênicas ou agentes causadores de câncer; 2) Mutagênicas ou agentes causadores de mutação e; 3) Teratogênicas ou agentes causadores de defeitos congênitos (NATARAJAN, 1993; SAKS *et al.*, 2017).

O dano do material genético das células somáticas pode levar à malignidade (câncer) em organismos eucarióticos e o dano genético nas células germinativas pode levar a mutações hereditárias induzindo defeitos congênitos. As mutações podem ser de qualquer natureza, incluindo a duplicação, inserção ou deleção de informações genéticas. Estas mutações podem causar diferentes tipos de problemas nos indivíduos, que podem variar desde diversos tipos de doenças até o câncer (SAVAGE, 1976). Uma das melhores maneiras de controlar os danos causados por agentes mutagênicos e carcinogênicos é identificar substâncias ou compostos químicos com atividade antimutagênica/anticlastogênica, isto é, aquelas que suprimem ou inibem o processo de mutagênese agindo diretamente no mecanismo celular, e desmutagênicas (que destroem ou inativam os processos mutagênicos parciais ou totais, afetando, conseqüentemente, uma menor população de células) a partir das plantas medicinais para que possam ser usadas como antimutagênicas e anticarcinogênica em aditivos alimentares ou medicamentosos (SEDGWICK *et al.*, 2007; SILVA *et al.*, 2008).

Para avaliar as moléculas genotóxicas, os pesquisadores analisam o dano produzido no DNA em células expostas às substâncias potencialmente tóxicas. Estes danos no material genético podem ser: 1) Na forma de rupturas de uma única, ou as duas, cadeias do DNA; 2) Bloqueio do reparo por excisão, ou seja, bloqueio na remoção da base nitrogenada defeituosa que é realizada através da clivagem da ligação base nitrogenada-desoxirribose, seguida pelo preenchimento da região com a base correta

através da ação da DNA-polimerase; 3) Reticulação, ou seja, bloqueio na atividade enzimática de proteases que eliminam proteínas danificadas e obsoletas; 4) Mutações de ponto e; 5) Aberrações cromossômicas estruturais e numéricas. A integridade comprometida do material genético tem sido relacionada diretamente ao desenvolvimento de câncer. Conseqüentemente, muitas técnicas sofisticadas, incluindo Ensaios Ames (que permite identificar substâncias com potencial para induzir mutações gênicas do tipo *frameshift* (alteração na fase de leitura dos códons devido a inserção ou deleção de pares de nucleotídeos) ou por substituição dos pares de base), testes de toxicologia *in vitro* e *in vivo*, como, por exemplo, o ensaio de cometa e micronúcleo, foram desenvolvidas para avaliar o potencial dos agentes químicos de induzirem danos ao DNA que podem levar ao câncer (NAGARATHNA *et al.*, 2013).

2.6.4.1. Mecanismos moleculares envolvidos na indução de aberrações cromossômicas

Uma das conseqüências finais da genotoxicidade é a mutação genética. Os compostos químicos mutagênicos causam mutações genéticas predominantes, que geralmente não são letais, mas podem constituir uma grande ameaça à integridade dos cromossomos e à viabilidade das células. No entanto, as células estão equipadas com vários sistemas de reparo do DNA. Dependendo das classes específicas de lesões no DNA, uma ou mais vias de reparo tornam-se ativas (WEI *et al.*, 2005). Quatro das cinco principais vias de reparo do DNA estão envolvidas no reparo de lesões que induzem mutações genéticas, sendo: 1) Reparo direto; 2) Reparo por excisão base (BER, do inglês *Base Excision Repair*); 3) Reparo por excisão de nucleotídeos (NER, do inglês *Nucleotide Excisions Repair*) e; 4) Reparo por incompatibilidade (MMR, do inglês *Mismatch Repair*) (EKER *et al.*, 2009). A quinta principal via de reparo envolvida é o reparo de rupturas de fita única/dupla do DNA (NAGARATHNA *et al.*, 2013).

2.6.4.1.1. Reparo direto

O reparo direto atua removendo as lesões do DNA por uma única reação enzimática sem erro e com alta especificidade ao substrato. Este mecanismo não requer um padrão, uma vez que o dano que eles restauram só ocorre em uma base e não há

envolvimento de incisão no esqueleto carbônico do carboidrato fosfatado (desoxirribose) ou na excisão da base. Estas lesões podem ocorrer devido a agentes alquilantes. O reparo direto é realizado por enzimas específicas chamadas DNA-metiltransferases (especificamente, a DNA-guanina metiltransferase (AGMT, do inglês *Guanine-DNA Methyl Transferases*)) que removem o grupo alquil do resíduo de guanina do DNA e o transferem para um de seus próprios resíduos de cisteína. Ao lado de AGMT, em bactérias e leveduras, as fotoliasas podem reverter diretamente o dano causado pelo DNA induzido por ultravioleta (UV) (MOURGUES; LOMAX; O'NEILL, 2007; SEDGWICK *et al.*, 2007).

2.6.4.1.2. Reparo por excisão de bases (BER)

O BER é um mecanismo celular que repara o DNA danificado ao longo do ciclo celular. Este mecanismo protege as células dos efeitos deletérios oriundos de danos ao DNA produzidos endogenamente por hidrólise, espécies reativas de oxigênio e outros metabolitos intracelulares e, também, é responsável pela remoção de muitas lesões induzidas por radiação ionizante e agentes alquilantes fortes. As principais enzimas envolvidas no BER são as DNA-glicosilases e as endonucleases AP. As DNA-glicosilases estão envolvidas na excisão da base danificada, sendo que o restante do sítio a-básico é processado, posteriormente, pelas endonucleases AP. O BER é dividido em reparo de fragmentos curtos (onde um único nucleotídeo é substituído) ou reparação de fragmentos longos (onde cerca de 2 a 10 nucleotídeos são substituídos) (SEEBERG; EIDE; BJØRÅS, 1995; VAN STEEG, 2001).

2.6.4.1.3. Reparo por excisão de nucleotídeo (NER)

O NER é uma via envolvida na remoção de vários tipos de lesões no DNA que se originam, principalmente, de fontes exógenas, como, por exemplo, substâncias químicas genotóxicas ou luz UV, que induzem adutos volumosos (isto é, um produto gerado pela adição direta de duas ou mais moléculas distintas, resultando em um único produto de reação contendo todos os átomos de todos os componentes iniciais, sendo que o resultado é considerado uma espécie molecular diferenciada) e ligações cruzadas de DNA (HANAWALT; FORD; LLOYD, 2003; WIJNHOFEN; VAN STEEG, 2003). O NER

repara o DNA por duas vias distintas: 1) Reparo genômico global (GGR, do inglês *Global Genome Repair*) e; 2) Reparo acoplado a transcrição (TCR, do inglês *Transcription-Coupled Repair*). Essas duas vias se diferenciam apenas na primeira etapa, a do reconhecimento do dano no DNA. A via GGR elimina o dano presente no DNA em genes ativos e inativos. O reconhecimento do DNA é realizado por um complexo de fatores proteicos (XPC-HR23B e XPE). A via TCR remove lesões de genes ativos. O principal gatilho no reconhecimento do dano no material genético é uma RNA-polimerase II bloqueada, a qual está acompanhada por proteínas presentes na síndrome de Cockayne (CS) (HOEIJMAKERS, 2001; NOUSPIKEL, 2009). As próximas etapas envolvidas no reparo do DNA estão relacionadas, principalmente, com a via GGR, porém, são idênticas na via TCR. Após a ligação do complexo proteico XPC-HR23B ao DNA danificado, várias outras proteínas são ligadas, formando um complexo denominado fator de transcrição IIIH (TFIIH, do inglês *Transcription Factor IIIH*). Posteriormente, ocorre a ligação da endonuclease XPG a esse complexo. O TFIIH possui atividade do tipo DNA-helicase com polaridade oposta (XPB e XPD) que desenrolam a dupla fita do DNA. Após a ligação da proteína de replicação A (RPA, do inglês *Replication Protein A*), o dano é verificado através da XPA e, subsequentemente, as endonucleases XPG e ERCC1/ XPF clivam fragmentos 3' e 5' na lesão presente no DNA. Isso resulta na liberação de um fragmento de cerca de 17 a 30 nucleotídeo contendo o dano genético. O espaço remanescente é preenchido por um complexo formado pela DNA-polimerase “d” ou “e”, proteínas de replicação acessória, antígeno nuclear de proliferação de células (PCNA, do inglês *Proliferating Cell Nuclear Antigen*), RPA e o fator de replicação C (YAN *et al.*, 2003).

2.6.4.1.4. Reparo por incompatibilidade

O MMR é um sistema que reconhece e repara inserções inadequadas de bases nitrogenadas. Estas podem surgir durante a replicação do DNA e o MMR é um esquema de reparo específico para este processo. Durante a síntese de DNA, a cadeia recém sintetizada (filha) pode incluir bases nitrogenadas incorretas. Neste caso, bases são inseridas gerando pares incompatíveis, como, por exemplo, G-T ou A-C. Para reparar esses pares de bases incompatíveis da maneira correta, é muito importante discriminar a cadeia recém sintetizada (incompatível) da cadeia de origem. O primeiro passo no MMR é o reconhecimento da incompatibilidade. Posteriormente, a cadeia original e a cadeia

filha são reconhecidas e a base incorporada incorretamente é excisada (clivada) e substituída pelo nucleotídeo correto. Durante esse processo de reparo não apenas o nucleotídeo incompatível é removido, mas algumas, ou até milhares, de bases nitrogenadas da cadeia de DNA recentemente sintetizada podem ser removidas e substituídas (NATARAJAN, 1993).

2.6.4.1.5. Reparo de aberrações cromossômicas

As aberrações cromossômicas representam a consequência final da genotoxicidade, são causadas por substâncias clastogênicas e podem ser estruturais (clastogênicas) ou numéricas (eugênicas). Os danos no DNA do tipo quebra da dupla fita (DSBs, do inglês *DNA Damages like Double-Strand Breaks*), ameaçam a integridade dos cromossomos e a viabilidade das células. Os DSBs não reparados ou mal reparados podem gerar mutações, rearranjos cromossômicos, morte celular e câncer (DRONKERT *et al.*, 2000; DUDÁŠ; CHOVANEC, 2004; MIRSALIS; MONFORTE; WINEGAR, 1994; WESOLY *et al.*, 2006). As aberrações numéricas dos cromossomos (aneuploidia) ocorrem tanto pela perda como ganho de cromossomos pelas células (como é o caso da trissomia do cromossomo 21 na síndrome de *Down*) e pode ser letal ou causar doenças genéticas. Contudo, os seres humanos possuem sistemas para reparar os DSBs. Em células de mamíferos, os DSBs são principalmente reparados por recombinação homóloga (HRR, do inglês *Homologous Recombination Repair*) ou reparo por união de extremidade não-homóloga (NHEJ, do inglês *Non-Homologous End-Joining Repair*) (ESSERS *et al.*, 2000; VAN GENT; HOEIJMAKERS; KANAAR, 2001). A principal diferença entre os sistemas de reparo HRR e NHEJ é a exigência de uma sequência de DNA homóloga em HRR, a qual é, portanto, um mecanismo livre de erros. Em contraste, o NHEJ, que não utiliza homologia de sequência, é um mecanismo propenso a erros (COUËDEL *et al.*, 2004; SWAGEMAKERS *et al.*, 1998). Outra diferença é a dependência do ciclo celular. O HRR, dependendo da presença de cromátides de irmãs intactas, é mais eficiente durante a fase S e G2 do ciclo celular, quando estas estão ativas na divisão de células. O NHEJ não depende de uma cadeia de DNA homóloga, ou seja, pode reparar os DSBs em todos os estágios do ciclo celular (G1, S e G2) (BANNISTER; SCHIMENTI, 2004; WETERINGS; VAN GENT, 2004).

Já está bem estabelecido que o sistema de reparo HRR atua no estágio embrionário, onde as células embrionárias são sensíveis às radiações ionizantes, porém,

sua ação em indivíduos adultos não foi detectada, a menos que o sistema NHEJ esteja bloqueado. Sendo assim, fica evidente que a contribuição de HRR e NHEJ pode variar dependendo do estágio de desenvolvimento de mamíferos (isto é, o tipo de célula) e do tipo específico de dano de DNA (NAGARATHNA *et al.*, 2013).

A avaliação da toxicidade genética não é um componente importante da avaliação de segurança de produtos químicos, incluindo medicamentos, produtos agrícolas, alimentícios, industriais e aditivos. Até o presente momento, os aspectos regulatórios da genotoxicidade tem como base os resultados qualitativos de ensaios de identificação de perigos, ou seja, as decisões geralmente são baseadas na classificação como positiva ou negativa para o potencial genotóxico. A maioria dos agentes carcinogênicos são identificados por estudos epidemiológicos. Esses estudos são, necessariamente, de longo prazo, já que nenhum efeito é evidente até décadas após a exposição à substância (GONZÁLEZ BORROTO *et al.*, 2003). Contudo, esses estudos são caros e os níveis de exposição e dos efeitos são difíceis de quantificar.

2.6.4.2. Estudo da genotoxicidade e mutagenicidade

Os estudos de genotoxicidade podem ser definidos como testes *in vitro* e *in vivo* projetados para identificar quaisquer substâncias ou compostos que possam induzir danos ao material genético, direta ou indiretamente por diversos mecanismos. Esses testes devem permitir a identificação de perigo em relação ao dano no DNA (CIMINO, 2006). A mudança genética desempenha apenas uma parte nos complexos efeitos hereditários e malignos que incluem a fixação do dano ao DNA por mutação genética, danos ou recombinação cromossômica em grande escala e alterações no número dos cromossomos. Esses testes desempenham um papel importante na predição se o composto tem potencial para causar genotoxicidade e carcinogenicidade (SHAH, 2012). Como parte do processo de avaliação de segurança, as agências reguladoras de todo o mundo requisitam informações sobre o potencial genotóxico dos novos medicamentos. A genotoxicidade geralmente é avaliada juntamente com outros aspectos toxicológicos, como, por exemplo, a toxicidade aguda e subcrônica, durante a avaliação de segurança (GEORGE, 2011).

Durante os estágios iniciais dos testes os mesmos ensaios são realizados tanto para prever um possível dano hereditário das células germinativas, como a carcinogenicidade, visto que esses parâmetros possuem precursores comuns. A relação entre a exposição a substâncias químicas específicas e a carcinogênese foi estabelecida, porém, tem sido

difícil estabelecer essa relação para doenças hereditárias. OS estudos genotóxicos têm sido associados e utilizados, principalmente, para a predição de carcinogenicidade de um composto (CAKMAK-DEMIRCIGIL; EMERCE; ULUTAS, 2009).

Considerando que os agentes químicos, físicos e biológicos podem interagir com o material genético, resultando em mutações (MALLING, 2004; MULLER, 1928), que estão associados à instabilidade genômica e câncer (MIYAMAE *et al.*, 1998), as agências reguladoras como a FDA, EMA e a ANVISA começaram a exigir testes de genotoxicidade como parte essencial da validação de novos medicamentos (HARTMANN *et al.*, 2004; SNYDER; GREEN, 2001). Esses testes incluem ensaios *in vitro* e *in vivo* para detectar o potencial que a droga possui para induzir mutações genéticas e/ou aberrações cromossômicas (ANVISA, 2013; FDA (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION), 2008).

A diretriz S2 (R1) sobre Teste de Genotoxicidade e Interpretação de Dados para Produtos Farmacêuticos Destinados ao Uso Humano é aplicada pela FDA, EMA e ANVISA para testar novas drogas em desenvolvimento. Este *guideline* sugere duas opções de baterias de testes: Opção 1) teste da mutação reversa em bactérias, seguido de um teste citogenético *in vitro* para avaliar danos cromossômicos (aberração cromossômica ou teste do micronúcleo) ou teste de mutação genética em células TK de linfoma de ratos e um teste *in vivo* (aberração cromossômica ou teste de micronúcleo); Opção 2) teste de mutação reversa e avaliação de genotoxicidade bacteriana e *in vivo* em tecidos hematopoiético (teste de micronúcleo) e outros testes *in vivo* (ANVISA, 2013; EMA (EUROPEAN MEDICINES AGENCY), 2012), como o ensaio do cometa (OECD, 2016a). No entanto, a orientação também permite o uso de diferentes métodos, para que o pesquisador/instituição possa provar a segurança do medicamento (ARALDI *et al.*, 2015).

Entre os testes de genotoxicidade disponíveis, o ensaio do cometa e o teste de micronúcleo são reconhecidos devido à sua robustez, sensibilidade e poder estatístico para avaliar quebras no DNA, que podem ser consideradas características de mutagenicidade (HEUSER *et al.*, 2008). Além disso, atualmente estudos apontam que a associação entre o ensaio do cometa e o teste do micronúcleo é a melhor bateria de testes disponíveis para avaliar o potencial mutagênico, uma vez que ambos os ensaios são altamente sensíveis, simples e permitem detectar quebras em níveis cromáticos e cromossômicos, respectivamente (OECD, 2016a). No entanto, em função da grande quantidade de protocolos publicados e das últimas descobertas e recomendações para o

ensaio do cometa e o teste do micronúcleo, torna-se necessária uma revisão sobre essas técnicas, considerando as possíveis aplicações destas análises com base na literatura e na experiência dos autores (FRÖTSCHL, 2015).

2.6.4.2.1. Ensaio do cometa

O ensaio do cometa, também conhecido como eletroforese em gel de células individualizadas (SCGE, do inglês *Single Cell Gel Electrophoresis*) ou eletroforese em microgel (MGE), foi introduzida por Ostling e Johanson (1984) para detectar danos ao DNA induzidos por radiação. Desde o seu desenvolvimento, foram propostas várias modificações metodológicas (HARTMANN *et al.*, 2003). No entanto, o método alcalino, desenvolvido por Singh e colaboradores (1988), que permite a desnaturação do DNA, bem como a detecção de sítios álcali-lábeis, tornou-se o mais utilizado e recomendado devido ao seu amplo espectro de detecção de danos ao DNA (COLLINS *et al.*, 2008; HARTMANN *et al.*, 2003).

Atualmente, o ensaio do cometa é utilizado em diferentes vertentes da pesquisa, como, por exemplo a toxicologia genética (ARALDI *et al.*, 2014; WADA *et al.*, 2014), biomonitorização (COLLINS *et al.*, 2014; CORTÉS-GUTIÉRREZ *et al.*, 2012), ecogenotoxicidade (COTELLE; FÉRARD, 1999; PELLEGGRI; GORBI; BUSCHINI, 2014), epidemiologia molecular (KRUSZEWSKI *et al.*, 2012), nutrigenômica (BISHOP *et al.*, 2015; DUTHIE; HAWDON, 1998), estudos do sistema de reparo do DNA (KANAAR; HOEIJMAKERS; VAN GENT, 1998; LANGIE *et al.*, 2011), avaliação da genotoxicidade de nanomateriais (HUK *et al.*, 2015), avaliação da integridade do DNA em células estaminais mesenquimatosas (FUCHS *et al.*, 2012) e espermatozóides (RIBAS-MAYNOU *et al.*, 2011, 2014). Além disso, este teste foi proposto para detectar a fragmentação de células bacterianas mediada por bacteriófagos (KHAIRNAR *et al.*, 2014) e empregada em plantas (POURRUT *et al.*, 2015).

Uma vez que nos dias atuais as pesquisas têm demonstrado sua versatilidade, o ensaio do cometa tem sido amplamente empregado nas pesquisas de genética toxicológica (ANDERSON; YU; MCGREGOR, 1998; ARALDI *et al.*, 2014; BURLINSON *et al.*, 2007; LENT *et al.*, 2012). Pode ser usado como um indicativo da atividade do vírus do papilomavírus humano (CALINISAN *et al.*, 2002) e do papilomavírus bovino (ARALDI *et al.*, 2013a). Estudos envolvendo o ensaio do cometa em virologia contribuíram para a elucidação dos mecanismos da oncogênese viral. A ação genotóxica do vírus do sarampo

(BHASKAR *et al.*, 2011) e o vírus da leucemia bovina (MOHAMED; ENDOH; OIKAWA, 2011) também foram relatados utilizando este ensaio. Sendo assim, o ensaio do cometa pode ser considerado um método padrão-ouro para os estudos dos processos oncogênicos associados à infecção por vírus (ZHU; YIN, 2007). Devido a sua versatilidade técnica, atualmente o ensaio do cometa foi incluído na Conferência Internacional sobre Harmonização de Requisitos Técnicos para o Registro de Medicamentos para Uso Humano (ICH, do inglês *International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceutical for Human Use*) S2R1 (FRÖTSCHL, 2015).

Após a padronização da metodologia do ensaio do cometa no *Workshop* Internacional sobre Procedimentos dos Testes de Genotoxicidade (IWGTP, do inglês *International Workshop on Genotoxicity Test Procedures*) (HARTMANN *et al.*, 2003) e o estabelecimento das recomendações técnicas no 4º *Workshop* Internacional sobre Testes de Genotoxicidade (BURLINSON *et al.*, 2007), este teste foi adotado como requisito obrigatório nos ensaios para validação de novos medicamentos pelas indústrias farmacêuticas (BRAMBILLA; MARTELLI, 2009; HARTMANN *et al.*, 2004). Assim, o ensaio do cometa *in vivo* em roedores foi validado entre 2006 e 2012 pelas seguintes agências e centros de validação: 1) “*Japanese Center for the Validation of Alternative Methods*” (JaCVAM) em conjunto com o “*European Center for the Validation of Alternative Methods*” (ECVAM); 2) “*Interagency of Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods*” (ICCVAM) e pela “*NTP Interagency Center of Evaluation of Alternative Toxicological Methods*” (NICEATM) (OECD, 2016a).

Um estudo com 838 medicamentos, analisados pelo ensaio do cometa, apontou que 56,3% deles são genotóxicos (BRAMBILLA; MARTELLI, 2009). Outros estudos, com 476 fármacos, também analisados por esta metodologia, demonstraram que 43,5% deles são genotóxicos (SNYDER; GREEN, 2001). Esses dados indicam a importância da avaliação mutagênica dos produtos farmacêuticos, bem como de potenciais novos medicamentos (BURLINSON *et al.*, 2007; HARTMANN *et al.*, 2003; HOBBS *et al.*, 2012). Além disso, recomenda-se, justamente com o ensaio do cometa, um teste mutagênico de primeira escolha devido à sua alta sensibilidade em relação ao teste de micronúcleos (HOBBS *et al.*, 2012).

O ensaio do cometa pode ser realizado com qualquer população de células eucarióticas *in vivo*, *in vitro* ou *ex vivo*, incluindo o tecido vegetal como, por exemplo, as células de *Allium cepa* (NAVARRETE *et al.*, 1997). Outras vantagens da técnica incluem

a simplicidade, baixo custo e tempo, uma vez que o protocolo pode ser executado em menos de 24 h (AL-SALMANI *et al.*, 2011; BURLINSON *et al.*, 2007; HARTMANN *et al.*, 2003; MCKELVEY-MARTIN *et al.*, 1993; MIYAMAE *et al.*, 1998). Além disso, o ensaio do cometa permite analisar a genotoxicidade em tecidos específicos, que estão em contato direto com a substância testada ou após ocorrer todo o processo farmacocinético (absorção, distribuição, metabolização e excreção), permitindo a detecção de clastogenicidade *in situ* (HARTMANN *et al.*, 2004, 2003). A técnica pode ser associada à hibridação *in situ* por fluorescência (FISH, do inglês *Fluorescent in situ Hybridization*), trazendo novas possibilidades de utilização para análise da indução de danos ao DNA (SPIVAK, 2015).

Devido todas as vantagens e aplicações desta técnica, o número de publicações envolvendo o ensaio do cometa aumentou nos últimos anos de forma consistente (COLLINS, 2015; KLAUDE *et al.*, 1996), tornando este teste um elemento de grande interesse na pesquisa (DEL BO' *et al.*, 2015; NERI *et al.*, 2015). O *PubMed* registra mais de 7600 citações de ensaio do cometa entre 1990 e 2013, reforçando a importância desta técnica (NERI *et al.*, 2015). Além disso, o banco de dados da *PubMed* registrou 737 publicações envolvendo o ensaio do cometa em 2014 e 173 em 2015.

O ensaio do cometa também permite detectar quebras nas cadeias de DNA, que podem ser visualizadas pelo aumento da migração de segmentos de DNA livres, resultando em imagens semelhantes à cometas, justificando o nome do ensaio (AZQUETA; COLLINS, 2013; GODSCHALK *et al.*, 2013). Existem três técnicas deste ensaio: 1) O ensaio ácido; 2) O ensaio alcalino e; 3) O ensaio neutro. A diferença entre as técnicas está no pH do tampão de eletroforese empregado. No início, foi estabelecido um paradigma de que a técnica neutra permite detectar fragmentações de cadeia dupla (DSBs, do inglês *Double Strand Breaks*), enquanto que a técnica alcalina, fragmentações de cadeia simples (SSBs, do inglês *Simple Strand Breaks*) (MCKELVEY-MARTIN *et al.*, 1993). No entanto, em qualquer das técnicas é possível a detecção de SSBs e DSBs (AZQUETA; COLLINS, 2013; HARTMANN *et al.*, 2003). Tanto as fragmentações do tipo SSBs como DSBs estão associados a aberrações cromossômicas e instabilidade genômica (PFEIFFER; GOEDECKE; OBE, 2000). A instabilidade genômica está diretamente associada à malignidade e, conseqüentemente, ao desenvolvimento de câncer (CHARAMES; BAPAT, 2003; TLSTY *et al.*, 1995).

2.6.4.2.1.1. Princípios técnicos e recomendações para o ensaio do cometa em pH alcalino

Esta foi a metodologia adotada na presente tese para análise de possíveis danos ao DNA provocados pelo extrato etanólico da *C. pubescens* em ratos.

O ensaio do cometa consiste na imobilização de uma suspensão celular em agarose de baixo ponto de fusão (LMPA, do inglês *Low Melting Point Agarose*), em lâminas pré-tratadas com agarose de ponto de fusão normal (NMPA, do inglês *Normal Melting Point Agarose*) (ARALDI *et al.*, 2013a; AZQUETA; COLLINS, 2013). Após a inserção da suspensão celular nas lâminas, o material é coberto com uma lamínula para assegurar uma distribuição homogênea. Após a solidificação em refrigerador, a lamínula é removida e as lâminas são transferidas para a solução de lise (ARALDI *et al.*, 2013a). Esta solução contém surfactantes celulares (Triton X 100), que removem as membranas das células (ANDERSON; YU; MCGREGOR, 1998; AZQUETA; COLLINS, 2013). Após isso, as lâminas são transferidas para a cuba de eletroforese onde recebem um tratamento com uma solução de cloreto de sódio, em uma concentração superior a 2,0 M e pH > 13,0 (ARALDI *et al.*, 2014). Esta solução promove a liberação das histonas e o desdobramento da dupla fita de DNA. No campo eletroforético, segmentos de DNA livres, produto de quebras (clastogênese), migram em direção ao cátodo (polo positivo), originando uma cauda de cometa (AZQUETA; COLLINS, 2013). Após a eletroforese, o material é neutralizado, fixado e corado. As lâminas são analisadas em microscopia de fluorescência ou microscopia óptica, de acordo com o corante utilizado (AZQUETA; COLLINS, 2013; ROJAS; LOPEZ; VALVERDE, 1999). Embora diferentes metodologias tenham sido publicadas, algumas recomendações foram estabelecidas para garantir a qualidade do resultado, como descritas a seguir:

1) Escolha do material biológico: o ensaio do cometa pode ser realizado em qualquer tecido, incluindo sangue total (CHUANG; HU, 2004), células mononucleares de sangue periférico (PBMCs, do inglês *Peripheral Blood Mononuclear Cells*) isoladas com tampão Ficoll-Paque ou Tris-EDTA (TE) (AL-SALMANI *et al.*, 2011) ou cultura celular (SINGH *et al.*, 1991). No entanto, os estudos de genotoxicidade de compostos químicos exigem atenção especial à idade do doador do material biológico. Pesquisas robustas demonstraram que o dano ao DNA aumenta progressivamente com a idade (CHEN; HALES; OZANNE, 2007; HEUSER *et al.*, 2008).

2) Conservação do material: estudos demonstraram que a conservação do sangue acima de 4° C induz danos no DNA, sendo recomendada a conservação em -20° C, -80° C ou -196° C (AL-SALMANI *et al.*, 2011; ALLIONE *et al.*, 2013; AZQUETA; COLLINS, 2013; CHUANG; HU, 2004; HININGER *et al.*, 2004). Pesquisas envolvendo amostras de sangue fresco e criopreservado confirmaram que a criopreservação não induz danos ao DNA (ALLIONE *et al.*, 2013; HININGER *et al.*, 2004). Recomenda-se que as amostras de tecido sejam preservadas a -20 ° C em meio de cultura, suplementadas com 10% de soro fetal bovino e 10% de DMSO (dimetilsulfóxido) (AZQUETA; COLLINS, 2013).

3) Condições de lise: a solução de lise empregada no ensaio do cometa é baseada na metodologia proposta por Cook e Brazeli (1976), a qual é composta por um detergente não-iônico e altas concentrações de cloreto de sódio. A lise remove a membrana plasmática, o citoplasma, o nucleoplasma e mais de 95% de todas as proteínas da célula, permitindo a migração de fragmentos duplos de DNA livres (COLLINS; DUŠINSKÁ; HORSKÁ, 2001; FAIRBAIRN; OLIVE; O'NEILL, 1995). A incubação deve ser realizada a 4° C para evitar possíveis danos ao DNA durante um tempo mínimo de 1 hora e máximo de quatro semanas (AZQUETA; COLLINS, 2013). A adição de DMSO à solução de lise também é necessária quando são empregadas amostras de sangue total para evitar danos ao DNA relacionados à hemólise. Após a lise, recomenda-se a lavagem do material em água destilada para remover resíduos da solução que possam afetar a eletroforese (HARTMANN *et al.*, 2003). Embora o tempo de lise possa variar de 1 hora a 1 semana, é importante que cada laboratório padronize um tempo de lise (ENCISO *et al.*, 2015).

4) Concentração de agarose: é considerada um fator crítico para a técnica (AZQUETA *et al.*, 2011). Recomenda-se a concentração de 1,0 a 1,5% de agarose de NMPA, que deve estar na temperatura de 60° C no momento da cobertura pré-deslizante das lâminas, e 0,6 a 0,8% de agarose LMPA, que deve estar a 37° C para homogeneização do material biológico (AZQUETA; COLLINS, 2013; HARTMANN *et al.*, 2003).

5) Condições eletroforéticas: É necessária a incubação do material em um tampão de eletroforese alcalino a 4° C durante 40 minutos para promover a liberação das histonas (AZQUETA; COLLINS, 2013). A eletroforese pode ser realizada nas seguintes condições: A) corrente constante de 300 mA, temperatura entre 4° C e 15° C (para evitar danos ao DNA), durante 20 minutos, empregando 1,15 V/cm ou ; B) 30 minutos a 0,8 V/cm (ARALDI *et al.*, 2013a, 2014; AZQUETA; COLLINS, 2013; FAIRBAIRN;

OLIVE; O'NEILL, 1995). Após a eletroforese, recomenda-se a lavagem das lâminas em um tampão neutralizante três vezes durante 5 minutos (ROJAS; LOPEZ; VALVERDE, 1999).

6) Método de coloração: Diferentes corantes podem ser utilizados no ensaio do cometa, incluindo coloração por sais de prata (GARCIA *et al.*, 2007; NADIN; VARGAS-ROIG; CIOCCA, 2001), brometo de etídio (EtBr), YOYO-1 (ROJAS; LOPEZ; VALVERDE, 1999), iodeto de propídio (PI) (ARALDI *et al.*, 2013a), DAPI (4',6-diamidino-2 fenilindol) (DUTHIE; COLLINS, 1997; ROJAS; LOPEZ; VALVERDE, 1999) e SYBR Gold (MCNAMEE *et al.*, 2000). Embora já se saiba que os corantes DAPI e YOYO-1 aumentam a sensibilidade da detecção do dano ao DNA (ROJAS; LOPEZ; VALVERDE, 1999), o EtBr e o PI são os corantes mais utilizados (ANDERSON; YU; MCGREGOR, 1998; KLAUDE *et al.*, 1996)

7) Análise do material: os nucleoides podem ser analisados por meio de métodos automatizados ou contagem e classificação visuais (GODSCHALK *et al.*, 2013). Os métodos automatizados são baseados em parâmetros de densitometria. Eles identificam a intensidade de fluorescência emitida e os aspectos geométricos dos nucleoides, como comprimento da cauda, diâmetro da cabeça e área do cometa (MCKELVEY-MARTIN *et al.*, 1993). O método visual consiste em analisar 100 nucleoides por lâmina, que são classificados de acordo com dois sistemas: 0-3 (ANDERSON; YU; MCGREGOR, 1998; ARALDI *et al.*, 2013a; SERPELONI; CÓLUS, 2008) ou 0-4 (AZQUETA; COLLINS, 2013) (figura 16), onde nucleoides sem dano do DNA são classificados como “dano 0” e, aqueles com danos máximos em “dano 3 ou 4”, dependendo do sistema utilizado. Com base no número de cometas observados por classe em um total de 100 nucleoides, o escore é obtido de acordo com a seguinte fórmula: $\text{Escore} = \sum i \times N_i$, onde “i” é a classe de dano do DNA (0 a 3 ou 0 a 4) e “ N_i ” é o número de nucleoides observados por classe (ÇELIK *et al.*, 2014; SERPELONI; CÓLUS, 2008; YASUHARA *et al.*, 2003). O método de análise visual possui preferência pelos pesquisadores quando comparado ao método automatizado porque os nucleoides sobrepostos podem ser classificados como um único cometa. Outro problema associado aos sistemas automatizados é o reconhecimento de cometas *hedgehog* (chamados de cometa ouriço, “células-fantasma”, “nuvens” ou “núcleo celular não detectável”), células com elevado dano ao DNA com características de células necróticas ou apoptóticas com cabeças pequenas ou inexistentes e caudas largas e difusas. Nestes casos, os *softwares* podem analisar a cabeça separadamente da cauda, classificando esses cometas como

classe zero (AZQUETA; COLLINS, 2013). Com base nesses dados, o método visual é adotado como preferência pela maioria dos laboratórios (ARALDI *et al.*, 2013a, 2014; COLLINS *et al.*, 2008; CORTÉS-GUTIÉRREZ *et al.*, 2012).

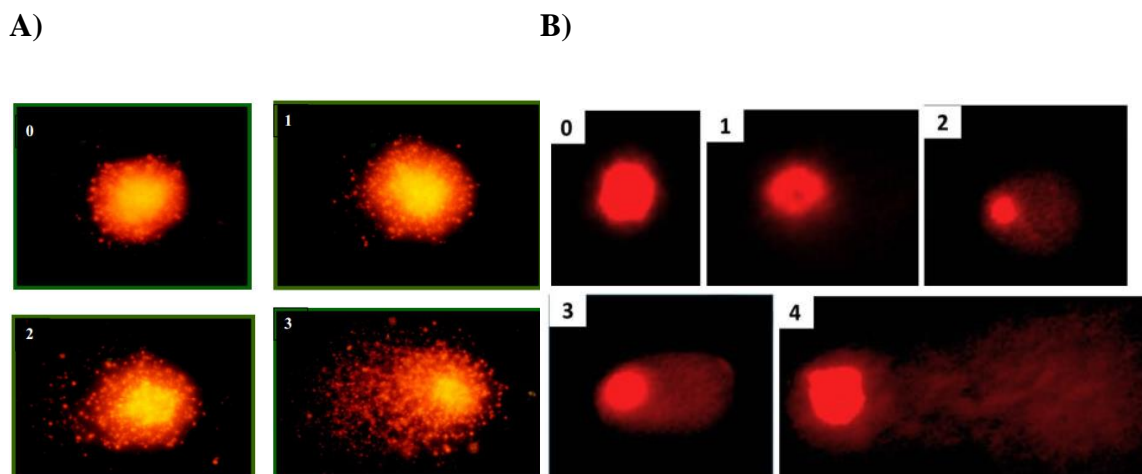


Figura 16. Classificação de nucleóides de acordo com dois sistemas.

A) 0 a 3, em que 0 representam células sem dano ao DNA e 3 células com dano máximo (SERPELONI; CÓLUS, 2008); **B)** 0 a 4, em que 0 representam células sem dano ao DNA e 4 células com o dano máximo (ARALDI *et al.*, 2015).

2.6.4.2.2. Ensaio do micronúcleo

O teste do micronúcleo é um importante biomarcador *in vivo* e *in vitro*, amplamente utilizado na epidemiologia molecular e pesquisas que envolvem danos citogenéticos em populações expostas a agentes genotóxicos (ARALDI *et al.*, 2013b; DEGEN *et al.*, 1997). O termo micronúcleo, também conhecido como corpúsculos de *Howell-Jolly* (KRISHNA; HAYASHI, 2000), foi introduzido em 1951 e se relacionava a fragmentos acêntricos expulsos do núcleo das células nos estágios tardios da anáfase (KIRSCH-VOLDERS *et al.*, 2003). Os micronúcleos podem ser formados através de dois mecanismos: 1) Rupturas cromossômicas (clastogênese) ou; 2) Bloqueio do aparelho mitótico (aneugênese) (BONASSI *et al.*, 2007; SWAPAN; DEY, 2010).

Utilizando anticorpos anticinetócoros é possível verificar se uma determinada droga induz a formação de micronúcleos através de clastogênese ou aneugênese através identificação de cinetócoros em cromossomas que sofreram um atraso da divisão celular e também detectar a presença de centrômeros específicos utilizando a técnica de FISH. O cinetócoro é um complexo que se monta no centrômero e se liga as fibras do fuso mitótico.

São formados por proteínas do arcabouço cromossômico que revestem as pontas dos cromossomos ligando-se aos telômeros, surgem no final da prófase e constituem os “motores moleculares” que movem os cromossomos na mitose e na meiose. A quebra de cromossomos através do cinetócoro difuso gera variação cromossômica numérica. Sendo assim, a ausência de cinetócoros nos micronúcleos indica ação clastogênica, enquanto sua presença, ação aneugênica (KRISHNA; HAYASHI, 2000).

Os micronúcleos são formados ao longo da eritropoiese, que ocorre na medula óssea ou baço de roedores adultos. Os eritroblastos perdem o núcleo após 6 horas do término da mitose, originando os eritrócitos policromáticos (PCE, do inglês *Polychromatic Erythrocytes*), que são células basofílicas que contêm RNA detectável no citoplasma através da coloração de *Giemsa* (KRISHNA; HAYASHI, 2000; MAVOURNIN *et al.*, 1990). Os PCEs sofrem um processo de maturação, originando os eritrócitos normocromático (NCEs, do inglês *Normochromic Erythrocytes*), que são células acidófilas que coram em laranja ou rosa-alaranjado com o corante *Giemsa*. Assim, os agentes clastogênicos e/ou aneugênicos são capazes de originar fragmentação cromossômica ou perdas cromossômicas inteiras durante a divisão celular, resultando em micronúcleos. Estes micronúcleos são envolvidos por uma membrana nuclear durante a telófase e podem ser visualizados no citoplasma. Uma frequência elevada de PCEs micronucleados (MNPCEs, do inglês *Micronucleated Polychromatic Erythrocytes*) indica danos cromossômicos (FENECH, 2000; FENECH; MORLEY, 1985; KRISHNA; HAYASHI, 2000).

No entanto, os micronúcleos não representam apenas perdas cromossômicas, mas também o resultado da amplificação do DNA (SWAPAN; DEY, 2010), que é comumente observada no processo oncogênico, resultando em cromossomos *Double-Minutes* (DM), que são removidos do núcleo celular, originando os micronúcleos (SHIMIZU; SHIMURA; TANAKA, 2000; SWAPAN; DEY, 2010). A formação do micronúcleo e sua liberação para o citoplasma está associada à carcinogênese (BONASSI *et al.*, 2007; TERRADAS *et al.*, 2010). A figura 17 esquematiza a formação de micronúcleos.

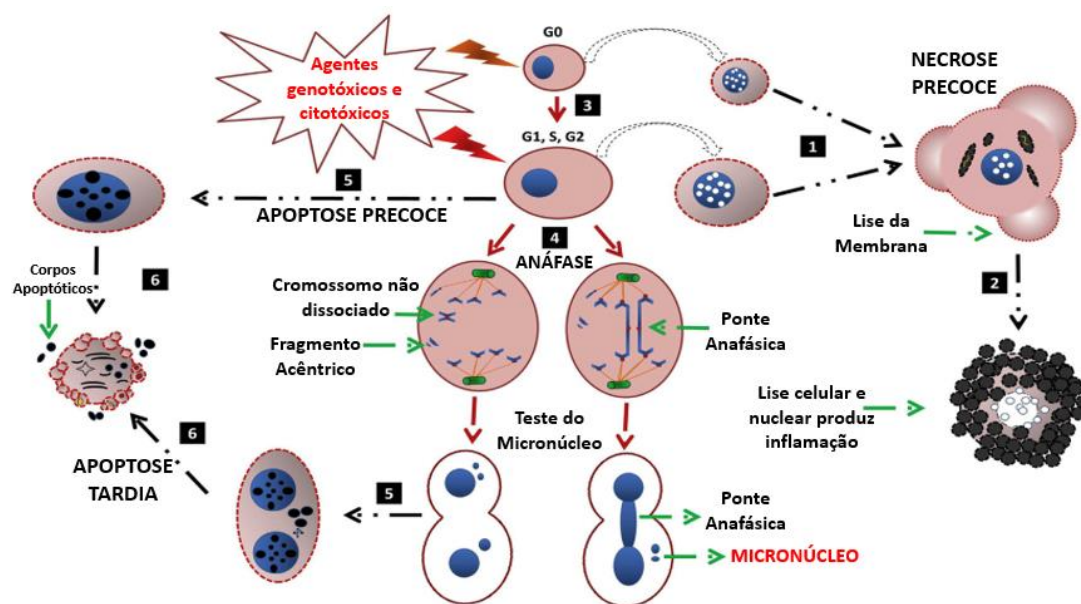


Figura 17. Diferentes vias de indução de mutagenese por drogas mutagênicas.

Os agentes citotóxicos induzem uma fase precoce de necrose (1), que evolui para a necrose (2). Os agentes genotóxicos induzem danos ao DNA durante as fases G0, G1, S e G2 do ciclo celular (3), que podem induzir a apoptose (5), resultando na formação de corpos apoptóticos, durante a fase tardia (6) ou gerando danos cromossômicos que resultam na formação de micrônucleos através de quebras cromossômicas e/ou bloqueio do aparelho mitótico (4). As células micrucleadas podem ser induzidas à apoptose (5 e 6).
 FONTE: Adaptado de ARALDI *et al.*, 2015.

Desde 1959, os micrônucleos foram propostos como marcadores de danos citogenéticos (KIRSCH-VOLDERS *et al.*, 2003). No entanto, a análise da frequência dos micrônucleos como um teste de citogenética foi proposto apenas na década de 70 por Boller e Schmid (1970) e empregada em eritrócitos policromáticos da medula óssea (HEDDLE, 1973) e linfócitos (COUNTRYMAN; HEDDLE, 1976). O teste do micrônúcleo tem sido frequentemente utilizado em estudos de genotoxicidade (OECD, 2016b; ŠUTIÁKOVÁ; KOVALKOVIČOVÁ; ŠUTIÁK, 2014) e pode ser aplicado a qualquer célula eucariótica, sendo, preferencialmente, usado em substituição ao teste de aberrações cromossômicas, visto que não requer análise de cariótipo (ALBERTINI *et al.*, 1997; FENECH; MORLEY, 1985; MILLER *et al.*, 1997; NORPPA; FALCK, 2003).

Algumas vantagens do teste do micrônúcleo em relação ao ensaio do cometa são: 1) Considera apenas danos genéticos em células mitóticas, enquanto que o ensaio do cometa detecta danos no DNA tanto na interfase quanto nas células mitóticas e; 2) O teste do micrônúcleo possui maior poder estatístico, já que analisa mais de 1000 células, enquanto que no ensaio do cometa apenas 100 células são analisadas (MILLER *et al.*,

1998). Embora o teste do micronúcleo tenha vantagens em relação ao teste de aberrações cromossômicas e o ensaio do cometa, estudos de toxicologia genética reforçam a necessidade de mais de um teste de mutagênese simultaneamente (ARALDI *et al.*, 2014; ÇELIK *et al.*, 2014; VAN GOETHEM; LISON; KIRSCH-VOLDERS, 1997). Assim, a associação do teste do micronúcleo ao ensaio do cometa pode ser considerada como um padrão-ouro entre os testes mutagênicos, visto que possuem alta sensibilidade, poder estatístico, são simples, versáteis, de baixo custo, tempo e investimentos. A figura 18 ilustra as células micronucleadas obtidas a partir do teste do micronúcleo *in vivo* e *in vitro*.

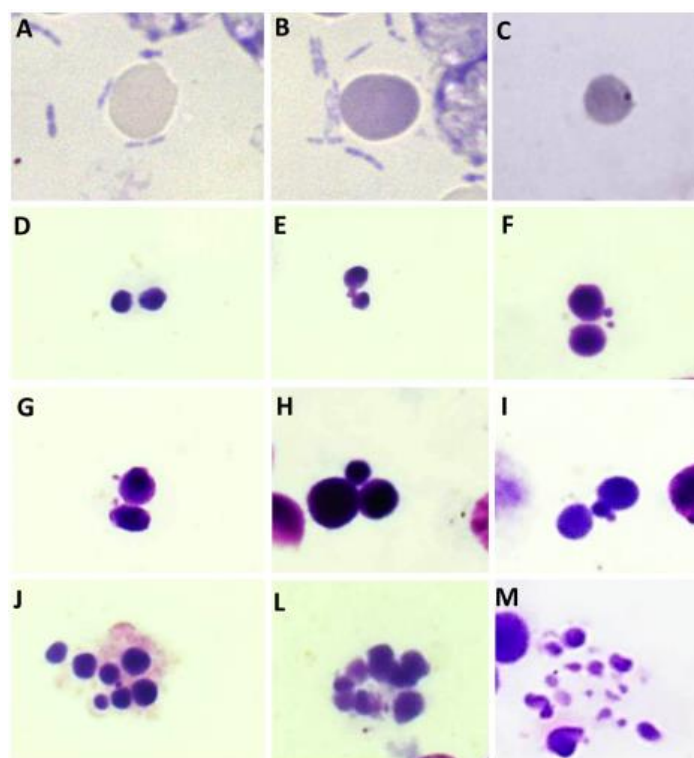


Figura 18. Células micronucleadas obtidas a partir do teste do micronúcleo *in vivo* e *in vitro*.

Micronúcleos observados *in vivo* (A-C) e *in vitro* (D-M). Imagens de eritrócitos visualizados na objetiva de 1000x: Normocromáticos (A), policromáticos (B) e policromático com micronúcleo (C). Imagens de linfócitos binucleados, visualizados em objetiva de 1000x: Normal, sem dano cromossômico (D), com ponte nucleoplasmática (E), mostrando dois micronúcleos (F-I). Imagens de corpos apoptóticos (J-M).

FONTE: ARALDI *et al.*, 2015.

2.6.4.2.2.1. Princípios técnicos e recomendações para o teste do micronúcleo

O teste do micronúcleo *in vivo* é mais recomendado do que o *in vitro*, pois permite avaliar os danos no DNA em função da farmacocinética da droga, ou seja, após a

exposição e absorção da substância teste para a corrente sanguínea (HAYASHI *et al.*, 2007; KRISHNA; HAYASHI, 2000). O teste do micronúcleo *in vivo* representa o ensaio de primeira escolha na bateria de testes de genotoxicidade aceitos por agências como FDA e EMA (KRISHNA; HAYASHI, 2000; KRISHNA; URDA; PAULISSEN, 2000). Embora diferentes metodologias tenham sido validadas, algumas recomendações foram estabelecidas para garantir a qualidade do resultado, como descritas a seguir:

1) Seleção das espécies: Embora seja possível a análise dos micronúcleos em qualquer espécie de roedor, o rato e o camundongo são as espécies mais comumente empregadas (ARALDI *et al.*, 2013b, 2014; HAYASHI *et al.*, 1994). No entanto, estudos apontaram que o baço tanto de ratos como de humanos é capaz de remover os MNPCEs da circulação sanguínea (ABRAMSSON-ZETTERBERG; GRAWÉ; ZETTERBERG, 1999; CAMMERER; ELHAJOUJI; SUTER, 2007). Por este motivo, a análise de frequência do MNPCE no sangue periférico só é aceita para camundongos (HAYASHI *et al.*, 2007). Recomenda-se o uso de animais com idade entre 6 e 8 semanas (ARALDI *et al.*, 2014; KRISHNA; URDA; PAULISSEN, 2000), de ambos os sexos, uma vez que diferentes respostas de biotransformação, toxicidade ou farmacocinética em geral podem ser observadas de acordo com o sexo (ARALDI *et al.*, 2014; HAYASHI *et al.*, 1994; MAVOURNIN *et al.*, 1990).

2) Concentração da dose e via de administração: Recomenda-se uma dose limite de 2000 mg/kg/dia para tratamentos de 14 dias ou menos ou 1000 mg/kg/dia para tratamento superior a 14 dias (HAYASHI *et al.*, 1994; KRISHNA; HAYASHI, 2000). A substância teste pode ser dissolvida em água ou solução salina isotônica, para compostos hidrófilos ou em óleo vegetal para substâncias lipofílicas. Os medicamentos podem ser administrados por via oral (através de gavagem), subcutânea ou intraperitoneal (HAYASHI *et al.*, 1994; RIBEIRO, 2003).

3) Controle: o teste do micronúcleo *in vivo* requer grupos de controle negativos, positivos e experimentais, cada um com, no mínimo, cinco animais. Como controle negativo, o veículo utilizado para a substância teste pode ser usado (ARALDI *et al.*, 2014; HAYASHI *et al.*, 1994). É necessário um controle positivo em todos os ensaios de toxicologia genética (KRISHNA; URDA; PAULISSEN, 2000). Foram utilizados diferentes medicamentos como controle positivo. Alguns exemplos de drogas e suas respectivas concentrações utilizadas como controle positivo para ratos são: etilmetanossulfonato (200 mg/kg), N-etil-N-nitrosourea (50 mg/kg), mitomicina C (50 mg/kg) e ciclofosfamida (40-50 mg/kg). O controle positivo pode ser administrado por

uma via diferente da droga testada (ARALDI *et al.*, 2014; KRISHNA; HAYASHI, 2000; RIBEIRO, 2003).

4) Obtenção da medula óssea: A medula óssea pode ser retirada entre 24 e 48 horas após a administração de dose única ou 18 a 24 horas após a última aplicação da substância teste (KRISHNA; HAYASHI, 2000). Um total de 2000 PCEs podem ser analisados, sendo observada a frequência de MNPCEs (HAYASHI *et al.*, 1994). Os micronúcleos podem ser corados com laranja de acridina (HAYASHI *et al.*, 1990; HAYASHI; SOFUNI; ISHIDATE, 1983), *Giemsa* (GOLLAPUDI; KAMRA, 1979), *Hoechst 33258* e pironina-Y (HAYASHI *et al.*, 1994).

Enfim, o ensaio do cometa e o teste do micronúcleo realizados simultaneamente permitem detectar substâncias aneugênicas e clastogênicas com alta sensibilidade e poder estatístico. O uso de ambos os testes permite também avaliar a genotoxicidade sistêmica ou *in situ*, uma vez que ambos os ensaios podem ser empregados em tecidos ou células específicas.

2.6.4.2.3. Ensaio do cometa integrado ao teste do micronúcleo e ao teste de toxicidade oral de doses repetidas por 28 dias

A integração do ensaio do cometa com o teste de toxicidade de doses repetidas é um esforço inovador dos cientistas, porém, ainda não muito explorada nesta área da pesquisa científica. A investigação da toxicidade genética desempenha um papel vital no desenvolvimento e comercialização de novos produtos para uso farmacêutico, agrícola, industrial e de consumo. Macgregor e colaboradores (1995) recomendaram a integração da análise de genotoxicidade ao teste de toxicidade oral de dose repetida no cenário industrial. Krishna e colaboradores (1998) progrediram o conceito sobre a integração dos testes e demonstraram que o teste do micronúcleo pode ser realizado com sucesso juntamente com estudos de toxicocinética que duram de 2 a 4 semanas. A integração bem-sucedida dos ensaios de genotoxicidade com os testes toxicológicos de rotina possui muitas vantagens para o desenvolvimento de novos produtos. Muitos esforços têm sido empregados pelo IWGTP para estabelecer protocolos e aspectos práticos para integração dos testes (HAYASHI *et al.*, 2000). O Regulamento de Registro, Avaliação, Autorização e Restrição de Substâncias Químicas (REACH, do inglês *Registration, Evaluation, Authorization and Restriction of Chemicals*) enfatiza que as novas tecnologias exigem uma mudança na maneira de condução dos estudos que avaliam a segurança para as

diferentes substâncias químicas. Além disso, as Estratégias Integradas de Testes (ITSs, do inglês *Integrated Testing Strategies*) já estão sendo utilizadas nas pesquisas toxicológicas, porém, o conceito de integração e aplicação no cenário regulatório ainda não foi totalmente implementado (HOFFMANN *et al.*, 2008). O Centro Comum de Pesquisas da Comissão Europeia afirma que um maior número de testes de genotoxicidade *in vivo* é essencial para avaliar a segurança de produtos químicos no âmbito do programa REACH. Em um *workshop* organizado pelo ECVAM realizado em junho de 2008, enfatizou-se que a integração dos testes de genotoxicidade ao estudo de toxicidade oral de doses repetidas, de maneira cientificamente justificada, pode reduzir o número dos animais utilizados nos testes de toxicidade (PFUHLER *et al.*, 2009).

Sekihashi e colaboradores (2001) compararam o efeito de vários tipos de compostos administrados por via intraperitoneal e oral por gavagem em roedores e concluíram que os resultados obtidos em ambas as vias de administração são semelhantes, portanto, aceitáveis para o ensaio do cometa. Além disso, Sekihashi e colaboradores (2002) demonstraram ainda que 49 de 54 substâncias carcinogênicas não induziram micronúcleos em roedores, no entanto, exibiram danos ao DNA no ensaio do cometa, sugerindo que o ensaio do cometa deve ser utilizado em testes *in vivo* simultaneamente aos ensaios citogenéticos em células do sistema hematopoiético de roedores. Atualmente, o ensaio do cometa tem sido amplamente utilizado em estudos regulatórios, mecanísticos e de biomonitorização em uma variedade de sistemas de testes *in vitro* e *in vivo* (LOVELL; OMORI, 2008).

Estudos recentes com o modelo de toxicidade oral de doses repetidas por 28 dias com metotrexato (MTX) (0,5, 1 e 2 mg/kg) induziram alterações significativas nos parâmetros de toxicidade, bem como o dano ao DNA observado pelo teste do micronúcleo e o ensaio do cometa (KUSHWAHA *et al.*, 2010). Estudos como esse corroboram com o sucesso da integração do ensaio de cometa junto ao teste do micronúcleo em estudos de toxicidade oral de doses repetidas realizados nos estágios iniciais do desenvolvimento de novos produtos.

A base científica que justifica a integração do ensaio do cometa e teste do micronúcleo ao teste de toxicidade oral de doses repetidas é a investigação do dano ao DNA nos diferentes tecidos, bem como a ampliação do espectro dos danos causados. Além disso, a integração destes testes de genotoxicidade com testes de toxicidade de rotina racionaliza a utilização de animais nas pesquisas, além de fornecer informações sobre danos ao DNA em órgãos-alvo específicos. Após o 4º IWGT, o ensaio do cometa

foi amplamente aceito pelas agências reguladoras internacionais como teste de genotoxicidade de primeira escolha. Todos estes esforços serão justificados, se a comunidade científica abordar e integrar os ensaios do cometa e micronúcleo aos estudos de toxicidade oral no estágio inicial da avaliação da segurança de novos produtos a nível internacional para a aceitação regulatória. No 5º IWGT novamente foi enfatizada a importância da integração do ensaio do cometa e micronúcleo aos estudos de toxicidade oral de doses repetidas (IWGT, 2009). Finalmente, pesquisas recentes demonstraram claramente que os parâmetros observados nos ensaios de genotoxicidade (teste do micronúcleo e ensaio do cometa) podem ser integrados com sucesso ao teste de toxicidade oral de doses repetidas (KUSHWAHA *et al.*, 2010)

2.6.4.2.4. Teste para detecção de Mutação e Recombinação Somática (SMART)

A genotoxicidade ocorre a partir da interação de um composto químico com material genético que produz dano ao DNA, resultando em doenças e/ou morte. Os testes de genotoxicidade são preconizados pelas agências reguladoras como parte dos ensaios necessários para determinação da segurança de determinados compostos à saúde humana e, desta forma, estão se tornando cada vez mais comuns em vários setores, incluindo indústrias farmacêuticas, cosméticas, automobilísticas, entre outros. Os efeitos colaterais tóxicos, incluindo os genotóxicos, representam a principal razão para o atraso ou encerramento do desenvolvimento de novos medicamentos (KOLA; LANDIS, 2004). Estes compostos são submetidos a vários testes complementares *in vitro* e *in vivo* para permitir a detecção de tais efeitos (BAJPAYEE *et al.*, 2005).

A introdução de testes mais rápidos e eficientes que podem ser realizados no início do desenvolvimento de novos medicamentos é um dos principais focos de interesse das pesquisas atuais. Devido a seus ciclos reprodutivos rápidos, maior aceitação ética e menor necessidade de infraestrutura, pequenos animais não-mamíferos, como vermes (*Caenorhabditis elegans*), peixe-zebra (*Daniorerio*) e moscas (*Drosophila melanogaster*) têm preferência no desenvolvimento de testes de genotoxicidade de alto rendimento. Em particular, o Teste de Mutação e Recombinação Somática (SMART) foi desenvolvido por Graf e colaboradores (1984), para detectar anormalidades genéticas de amplo espectro, como mutação, deleção e recombinação, em *D. melanogaster*. Basicamente, o SMART avalia a perda de heterozigosidade (LOH) resultante da genotoxicidade (FRAGIORGE *et al.*, 2008; GRAF *et al.*, 1984; VOGEL *et al.*, 1998). O princípio do teste baseia-se no fato

de que, durante o desenvolvimento embrionário de *D. melanogaster*, grupos celulares de discos imaginiais se proliferam mitoticamente até sua metamorfose, diferenciando-se em estruturas visualizadas na mosca adulta. Assim, se uma alteração genética ocorre em um disco imaginal da asa, um clone de célula mutante é formado, que pode ser detectado como uma mancha na superfície do corpo da mosca (GRAF, 1995). A análise desses pontos determina a expressão fenotípica dos genes marcadores mutantes, como, *mwh* (do inglês, *multiple wing hairs*), que produz tricomas múltiplos por célula ao invés dos tricomas únicos normais, e *flr* (do inglês, *flare*) que afeta a forma do pêlo da asa produzindo pêlos malformados em forma de chama. Sendo assim, após as moscas serem expostas a uma determinada substância teste, a visualização dos fenótipos descritos acima nos pêlos das asas em moscas adultas permite a caracterização de LOH e, conseqüentemente, a detecção da genotoxicidade. Além disso, o SMART também é eficaz em detectar genotoxicidade associada a substâncias químicas biotransformadas [11-12], bem como efeitos antigenotóxicos (ABRAHAM; GRAF, 1996; YUN *et al.*, 2000).

Na presente pesquisa, o teste SMART foi realizado por meio de cruzamentos experimentais entre três linhagens mutantes de *D. melanogaster* portadoras dos seguintes marcadores genéticos: 1) *mwh*, que possui manifestação fenotípica caracterizada por três ou mais pêlos por célula da asa; 2) *ORR/flr3*, que apresenta pelos simples e; 3) *flr*, com caracterização fenotípica manifestada por um pêlo modificado em forma de chama. A partir destas linhagens cruzamentos são realizados, sendo: 1) cruzamento padrão ST (do inglês, *ST-standard cross*) entre machos *mwh* e fêmeas virgens *flr3* (GRAF *et al.*, 1984); e 2) cruzamento de alta bioativação HB (do inglês, *HB-high bioactivation cross*) entre machos *mwh* e fêmeas virgens *ORR/flr3* (GRAF; VAN SCHAIK, 1992).

Após o cruzamento, são coletados ovos durante 8 horas em frascos de cultura contendo uma base sólida de ágar e uma camada espessa de levedura (*Saccharomyces cerevisiae*) suplementada com sacarose. Após isso, em uma idade pré-selecionada de cultura, as larvas são lavadas nos frascos com água corrente e coletadas em peneira. Estas larvas derivadas do cruzamento ST e HB podem ser tratadas cronicamente (1 a 4 dias) ou agudamente (1 a 6h) com compostos por administração via oral ou inalatória. No procedimento padrão, larvas de 3 dias são alimentadas até o final do desenvolvimento larval. Em qualquer tratamento crônico, as larvas são colocadas em frascos com meio instantâneo para *Drosophila* ou purê de batata, contendo o composto testado. Depois da eclosão, as moscas são coletadas dos frascos de exposição e estocadas em etanol 70%.

Ambos cruzamentos, ST e HB, produzem dois tipos de progênie que podem ser distinguidas fenotipicamente baseado no marcador BdS: 1) moscas marcadoras trans-heterozigotas ($mwh\ flr^+/mwh^+\ flr3$, fenotipicamente asas tipo selvagem) e; 2) moscas balanceadoras-heterozigotas ($mwhflr^+/TM3\ BdS$, fenotipicamente asas serrilhadas). As asas são montadas em solução de Faure. As superfícies dorsal e ventral das asas são analisadas sob microscopia óptica para a ocorrência de manchas simples (*mwh* ou *flr3*) ou manchas gêmeas (clone *mwh* adjacente ao *flr3*). O tamanho, a posição e a frequência das manchas são registradas. Os diferentes tipos de manchas são devido a mecanismos genotóxicos: eventos mutacionais (mutação de ponto, deleção ou tipos específicos de translocação) assim como recombinação mitótica (GRAF *et al.*, 1984).

2.6.5. Toxicidade versus segurança das plantas medicinais

O uso das plantas medicinais e fitonutrientes ou nutracêuticos tem aumentado rapidamente em todo o mundo, com muitas pessoas recorrendo a esses recursos para o tratamento de várias patologias em diferentes contextos internacionais de saúde (WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION), 2004). Na década passada, houve um aumento significativo na aceitação e interesse do público em relação as terapias naturais tanto nos países em desenvolvimento como nos países desenvolvidos e, além disso, as plantas medicinais estão disponíveis não apenas nas farmácias, mas agora também em lojas e supermercados. Estima-se que até quatro bilhões de pessoas (representando 80% da população mundial) que vivem no mundo em desenvolvimento dependem dos medicamentos à base de plantas como fonte primária de cuidados a saúde e a prática médica tradicional que envolve o uso de ervas é vista como parte integrante da cultura nessas comunidades (BANDARANAYAKE, 2006; BODEKER *et al.*, 2005; MUKHERJEE, 2002).

À medida que o uso global de medicamentos à base de plantas cresce e muitos produtos novos são introduzidos no mercado, os problemas de saúde pública e as preocupações em torno de sua segurança também estão cada vez mais presentes. Embora alguns medicamentos à base de plantas tenham potencial terapêutico promissor e sejam amplamente utilizados, muitos deles permanecem sem os testes adequados de toxicidade, genotoxicidade e teratogenicidade, afim de avaliar a segurança para aqueles que consomem estes produtos. Isso torna o conhecimento de seus potenciais efeitos adversos muito limitados e a identificação das terapias mais seguras e eficazes, bem como a

promoção de seu uso racional mais difícil (WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION), 2002). Além disso, já está bem estabelecido que a segurança da maioria dos produtos à base de plantas ainda é precária devido à falta de controle de qualidade adequado na sua produção, bem como a rotulagem inadequada e, conseqüentemente, a ausência de informações apropriadas para o paciente (RAYNOR *et al.*, 2011).

Como consequência do aumento global da utilização das plantas medicinais, tornou-se essencial, para fornecer ao público em geral, incluindo os profissionais de saúde, informações adequadas para facilitar uma melhor compreensão dos riscos associados à utilização destes produtos e assegurar que todos os medicamentos sejam adequadamente seguros e de qualidade (EKOR, 2014).

Sabe-se que a maioria dos problemas associados ao uso de medicamentos fitoterápicos decorre principalmente da classificação de muitos desses produtos como alimentos ou suplementos dietéticos em alguns países. Devido a isso a evidência de qualidade, eficácia e segurança desses medicamentos à base de plantas não é obrigatória antes do desenvolvimento do *marketing* destes produtos. Além disso, os testes de qualidade e as boas práticas de manipulação/produção tendem a ser menos rigorosas e/ou controladas. A segurança dos medicamentos à base de plantas tornou-se, portanto, uma grande preocupação tanto para as autoridades internacionais de saúde como para o público em geral (KASILO; TRAPSIDA, 2011).

Na maioria dos países, os medicamentos fitoterápicos e produtos relacionados são introduzidos no mercado sem qualquer avaliação obrigatória de segurança ou toxicológica. Muitos desses países também não possuem mecanismos efetivos para regular práticas de fabricação e padrões de qualidade. Esses produtos à base de plantas são continuamente disponibilizados para os consumidores sem prescrição médica e os riscos potenciais que o produto oferece à saúde humana são incompreendidos (BANDARANAYAKE, 2006).

É importante ressaltar a taxa surpreendente a respeito do interesse nas plantas medicinais. Ao longo da última década, o uso destas plantas representa aproximadamente 40% das prescrições nos serviços de saúde na China. Na Austrália, Canadá, EUA, Bélgica e França o percentual estimado de uso das plantas medicinais é de 48 %, 70%, 42%, 38% e 75%, respectivamente (FOSTER *et al.*, 2001; WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION), 2002). Apesar da percepção positiva dos pacientes sobre o uso dos medicamentos fitoterápicos e satisfação alegada com os resultados terapêuticos,

juntamente com a decepção com as terapias alopáticas convencionais em termos de eficácia e/ou segurança, o problema da segurança dos medicamentos à base de plantas continua sendo uma questão importante de preocupação (EKOR, 2014).

A percepção de que os medicamentos à base de plantas são muito seguros e desprovido de efeitos tóxicos é enganadora. Muitas plantas demonstraram ser capazes de induzir uma ampla gama de reações indesejáveis ou adversas, algumas das quais capazes de causar lesões graves, condições que ameaçam a vida e até a morte. Numerosos e irrefutáveis casos de intoxicação foram relatados na literatura (COSYNS *et al.*, 1999; ERNST, 2002; VANHERWEGHEM; DEGAUTE, 1998).

Recentemente, Auerbach e colaboradores (2012) demonstraram uma correlação entre o uso de fitoterápicos e o desenvolvimento de fibrose hepática entre os participantes de um estudo conduzido na Uganda. Uma série de medicamentos à base de plantas chinesas e vários outros medicamentos à base de plantas de diferentes partes do mundo também foram implicados em casos de intoxicação. Muitos deles revelaram conter substâncias tóxicas que são capazes de reagir com macromoléculas celulares, incluindo DNA, causando toxicidade celular e/ou genotoxicidade (RIETJENS *et al.*, 2005).

As reações adversas ou efeitos tóxicos que as plantas podem causar incluem desde alergias na pele e mucosas, até distúrbios cardiovasculares, respiratórios, metabólicos, gastrintestinais, neurológicos e em alguns casos o óbito (Vasconcelos *et al.*, 2009). Com o intuito de documentar e controlar a ocorrência de intoxicações por plantas, em 1998 foi criado o Programa Nacional de Informações sobre Plantas Tóxicas, inserido no Sistema Nacional de Informações Toxicofarmacológicas (SINITOX), sendo que os Centros de Informação e Assistência Toxicológica (CATs) são responsáveis pelo registro das ocorrências de intoxicação (SINITOX, 2012).

O número de intoxicações causadas por plantas no Brasil em 2012 foi de 1026 casos, representando 1,2% dos casos de intoxicação humana ocorridos e ocupando o 13º lugar em intoxicações no país (SINITOX, 2012). Apesar de intoxicações humanas fatais causadas por plantas serem raras e o número total de ocorrências registradas ser baixo, os dados estatísticos devem ser analisados com cautela, pois muitos casos não são registrados ou são notificados como exposição a agente tóxico desconhecido (MONSENY *et al.*, 2015).

3. OBJETIVOS

3.1. Geral

Avaliar o potencial efeito antidepressivo e ansiolítico, bem como toxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade do extrato etanólico dos frutos da *Campomanesia pubescens* (EEFCP) em ratos Wistar.

3.2. Específicos

Primeira Fase – Análise da toxicidade:

- Determinar o perfil fitoquímico do EEFCP;
- Estimar a DL50 do EEFCP através do modelo de toxicidade oral aguda “*Up-and-Down*” Procedure;
- Investigar o potencial tóxico sistêmico do EEFCP através do modelo de toxicidade oral por doses repetidas por 28 dias (toxicidade a curto prazo);
- Determinar os efeitos histopatológicos do EEFCP após exposição a curto prazo.
- Identificar e avaliar as alterações genotóxicas e mutagênicas após exposição a curto prazo ao EEFCP através de testes em roedores e do Teste para detecção de Mutação e Recombinação Somática (SMART)

Segunda fase – Análise do efeito antidepressivo:

- Avaliar o efeito antidepressivo do EEFCP em ratos com comportamento anedônico induzido pelo modelo de estresse brando crônico e imprevisível através dos testes de preferência por sacarose e nado forçado.
- Avaliar o efeito do EEFCP na atividade motora de animais submetidos ao teste do campo aberto.

Terceira fase – Análise do efeito ansiolítico:

- Avaliar o efeito ansiolítico do EEFCP em diferentes modelos comportamentais de ansiedade, sendo: 1) Labirinto em Cruz Elevado; 2) Campo Aberto e; 3) Teste de esconder esferas (*Marble-Burying*).

4. CONCLUSÕES

4.1. Geral

O extrato etanólico dos frutos *Campomanesia pubescens* (D.C.) O. BERG (EEFCP) não exibiu alto potencial de toxicidade pré-clínica em ratos Wistar e possui efeitos ansiolítico e antidepressivo.

4.2. Específicas

- O EEFCP possui altos teores de flavonoides;
- Cinco flavonoides foram isolados a partir do EEFCP, sendo que 2 foram isolados a partir da fração hexânica (**1** 2-hidroxi-3'-metil-4',6'-dimetoxichalcona e **2** 7-hidroxi-5-metoxi-6-metilflavanona) e 3 da fração acetato de etila (**3** 5-hidroxi-7-metoxi-8-metilflavanona; **4** 2',4'-dihidroxi-3',5'-dimetil-6'-metoxichalcona e **5** 2',4'-dihidroxi-5'-metil-6'-metoxichalcona);
 - A DL₅₀ estimada para o EEFCP é maior que 2000 mg/kg;
 - De acordo com os dados da química clínica e histopatológicos não houve toxicidade sistêmica relevante no teste de toxicidade a curto prazo. No entanto, anormalidades nos níveis de globulinas, cálcio e glicemia, acima dos valores de referência normais para a espécie testada, foram observadas e, como o significado de tais alterações não está totalmente claro, estudos adicionais em animais e seres humanos são necessários para investigar sua relação com a exposição ao EEFCP e fornecer dados de segurança suficientes para consumo humano;
 - Nas condições experimentais utilizadas no presente trabalho, nossos resultados fornecem as primeiras evidências de que o EEFCP, administrado por via oral (gavagem), não é genotóxico para as células de sangue periférico e não possui ação clastogênica/aneugênica em células de medula óssea dos ratos. Os metabólitos de biotransformação do EEFCP não apresentam atividade genotóxica, como demonstrado pelo teste SMART nos descendentes do cruzamento de alta bioativação.
 - O EEFCP nas doses de 250 mg/kg e 500 mg/kg reverteram o comportamento anedônico mensurado pelo TPS e reduziram significativamente o tempo de imobilidade dos animais submetidos ao estresse após 2 semanas de tratamento, sugerindo importante efeito antidepressivo;
 - O tratamento agudo com o EEFCP nas doses de 250 mg/kg e 500 mg/kg aumentou o percentual de entradas e tempo gasto nos braços abertos do LCE, além de

aumentar a locomoção, o número de *rearing* e reduzir o tempo de *grooming* no do CA, demonstrando o efeito ansiolítico do extrato;

➤ Testes futuros com os flavonoides isolados são necessários para confirmar as hipóteses levantadas e determinar o mecanismo de ação das substâncias. Isso permitirá o desenvolvimento de novas terapias ansiolíticas e antidepressivas com menores índices de efeitos adversos, menor tempo de latência para início do efeito terapêutico, acesso maximizado à população e, conseqüentemente, maior adesão dos pacientes ao tratamento.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHAM, S. K.; GRAF, U. Protection by coffee against somatic genotoxicity in drosophila: Role of bioactivation capacity. **Food and Chemical Toxicology**, v. 34, n. 1, p. 1–14, 1996.

ABRAMSON, L.; SELIGMAN, M. E. P. Modeling psychopathology in the laboratory: history and rationale. In: MASER, J.; SELIGMAN, M. E. P. (Eds.). **Psychopathology: experimental models**. San Francisco: Freeman, 1977.

ABRAMSSON-ZETTERBERG, L.; GRAWÉ, J.; ZETTERBERG, G. The micronucleus test in rat erythrocytes from bone marrow, spleen and peripheral blood: The response to low doses of ionizing radiation, cyclophosphamide and vincristine determined by flow cytometry. **Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 423, n. 1–2, p. 113–124, 1999.

ADACHI, M. *et al.* Selective Loss of Brain-Derived Neurotrophic Factor in the Dentate Gyrus Attenuates Antidepressant Efficacy. **Biological Psychiatry**, v. 63, n. 7, p. 642–649, 2008.

AGUIAR, D. C.; GUIMARÃES, F. S. Blockade of NMDA receptors and nitric oxide synthesis in the dorsolateral periaqueductal gray attenuates behavioral and cellular responses of rats exposed to a live predator. **Journal of Neuroscience Research**, v. 87, n. 11, p. 2418–2429, 2009.

AL-SALMANI, K. *et al.* Simplified method for the collection, storage, and comet assay analysis of DNA damage in whole blood. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 51, n. 3, p. 719–725, 2011.

ALBERTINI, S. *et al.* Detailed data on in vitro MNT and in vitro CA: Industrial experience. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 392, n. 1–2, p. 187–208, 1997.

ALBUQUERQUE, U. P. DE; HANAZAKI, N. As pesquisas etnodirigidas na descoberta de novos fármacos de interesse médico e farmacêutico: fragilidades e perspectivas. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, p. 678–689, 2006.

ALLIONE, A. *et al.* Validation of the nucleotide excision repair comet assay on cryopreserved PBMCs to measure inter-individual variation in DNA repair capacity. **Mutagenesis**, v. 28, n. 1, p. 65–70, 2013.

ALONSO, R. *et al.* Blockade of CRF1 or V1b receptors reverses stress-induced suppression of neurogenesis in a mouse model of depression. **Molecular Psychiatry**, v. 9, n. 3, p. 278–286, 2004.

ANACKER, C. *et al.* The glucocorticoid receptor: Pivot of depression and of antidepressant treatment? **Psychoneuroendocrinology**, v. 36, n. 3, p. 415–425, 2011a.

ANACKER, C. *et al.* Antidepressants increase human hippocampal neurogenesis by activating the glucocorticoid receptor. **Molecular Psychiatry**, v. 16, n. 7, p. 738–750, 2011b.

ANDERSEN, M. E. *et al.* The future of toxicity testing. **Journal of Toxicology and Environmental Health - Part B: Critical Reviews**, v. 13, n. 2–4, p. 163–196, 2010.

ANDERSEN, M. E.; KREWSKI, D. The vision of toxicity testing in the 21st century: Moving from discussion to action. **Toxicological Sciences**, v. 117, n. 1, p. 17–24, 2010.

ANDERSON, D.; YU, T. W.; MCGREGOR, D. B. Comet assay responses as indicators of carcinogen exposure. **Mutagenesis**, v. 13, n. 6, p. 539–555, 1998.

ANISMAN, H.; ZACHARKO, R. M. Multiple neurochemical and behavioral consequences of stressors: Implications for depression. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 46, n. 1, p. 119–136, 1990.

ANVISA. **Guia para a condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos. Versão 2.** Brasília, 2013. Disponível em:

<<http://portal.anvisa.gov.br/documents/33836/351410/Guia%2Bde%2BEstudos%2BN%25C3%25A3o%2BC1%25C3%25ADnicos%2B%2Bvers%25C3%25A3o%2B2.pdf/0afb3f3b-7a32-4232-a7e2-de8ef460c9f7>>

ANVISA. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária. [Online].** Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/Anvisa+Portal/Anvisa/Inicio/Medicamentos/Asunto+de+Interesse/Medicamentos+fitoterapicos.>>. Acesso em: 26 jan. 2018.

ANVISA. **Consolidado de normas da COFID. Versão V.** Agência de Vigilância Sanitária, 2015.

APA (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION). **Diagnostic and statistical manual of mental disorders (fifth ed.).** 5^a ed. Arlington, VA: American Psychiatric Association, 2013.

APRISON, M. H.; FERSTER, C. B. Neurochemical correlates of behavior II. Correlation of brain monoamine oxidase activity with behavioural changes after iproniazid and 5-hydroxytryptophan administration. **J Neurochem**, v. 5, p. 350–357, 1961.

ARALDI, R. P. *et al.* Bovine Papillomavirus Clastogenic Effect Analyzed in Comet Assay. **BioMed Research International**, v. 2013, n. 5, p. 1–7, 2013a.

ARALDI, R. P. *et al.* Análise do potencial mutagênico dos esteroides anabólicos androgênicos (EAA) e da l-carnitina mediante o teste do micronúcleo em eritrócitos policromáticos. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 19, n. 6, p. 448–451, 2013b.

ARALDI, R. P. *et al.* Mutagenic potential of *Cordia ecalyculata* alone and in association with *Spirulina maxima* for their evaluation as candidate anti-obesity drugs. **Genetics and Molecular Research**, v. 13, n. 3, p. 5207–5220, 2014.

- ARALDI, R. P. *et al.* Using the comet and micronucleus assays for genotoxicity studies: A review. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 72, p. 74–82, 2015.
- ARCHER J.; BOWER, P.; GILBODY, S.; LOVELL, K.; RICHARDS, D.; GASK, L.; *et al.* Collaborative care for depression and anxiety problems. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, v. 10, 2012.
- ARMARIO, A.; GAVALDÀ, A.; MARTÍ, J. Comparison of the behavioural and endocrine response to forced swimming stress in five inbred strains of rats. **Psychoneuroendocrinology**, v. 20, n. 8, p. 879–890, 1995.
- AUERBACH, B. J. *et al.* Traditional Herbal Medicine Use Associated with Liver Fibrosis in Rural Rakai, Uganda. **PLoS ONE**, v. 7, n. 11, p. 5–12, 2012.
- AYENSU, W. K. *et al.* Effects of chronic mild stress on serum complement activity, saccharin preference, and corticosterone levels in Flinders lines of rats. **Physiology and Behavior**, v. 57, n. 1, p. 165–169, 1995.
- AZQUETA, A. *et al.* Towards a more reliable comet assay: Optimising agarose concentration, unwinding time and electrophoresis conditions. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 724, n. 1–2, p. 41–45, 2011.
- AZQUETA, A.; COLLINS, A. R. The essential comet assay: A comprehensive guide to measuring DNA damage and repair. **Archives of Toxicology**, v. 87, n. 6, p. 949–968, 2013.
- BAGHAI, T. C. *et al.* General and comparative efficacy and effectiveness of antidepressants in the acute treatment of depressive disorders: A report by the WPA section of pharmacopsychiatry. **European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience**, v. 261, n. 3, p. S207–S245, 2011.
- BAJPAYEE, M. *et al.* Current status of short-term tests for evaluation of genotoxicity, mutagenicity, and carcinogenicity of environmental chemicals and NCEs. **Toxicology Mechanisms and Methods**, v. 15, n. 3, p. 155–180, 2005.
- BALDWIN, D. S.; AJEL, K. I.; GARNER, M. Pharmacological treatment of generalized anxiety disorder. In: STEIN, M. B.; STECKLER, T. (Ed.). **Behavioral Neurobiology of Anxiety and Its Treatment. Current Topics in Behavioural Neurosciences**. Heidelberg, Germany.: Springer-Verlag, 2010. p. 255–260.
- BALLVE, A. C. *et al.* **Plantas medicinais de uso popular (Atlas Farmacognóstico)**. 1th. ed. Canoas: Editora Ulbra, 1995.
- BANAŚ, A. *et al.* Comorbidity of somatic and depressive disorders. **Psychiatr. Prakt. Ogólnolek.**, v. 5, n. 2, p. 69–73, 2005.
- BANDARANAYAKE, W. M. “Quality control, screening, toxicity, and regulation of herbal drugs”. In: AHMAD, I.; AQIL, F.; OWAIS, M. (Eds.). **Modern Phytomedicine. Turning Medicinal Plants into Drugs**. Wiley, 2006. p. 120.

- BANERJEE, S. P. *et al.* Development of beta- adrenergic receptor subsensitivity by antidepressants. **Nature**, v. 268, p. 455–456, 1977.
- BANNISTER, L. A.; SCHIMENTI, J. C. Homologous recombinational repair proteins in mouse meiosis. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 107, n. 3–4, p. 191–200, 2004.
- BARBOSA, J. **Campomanesia lineatifolia Ruiz e Pav.: Estudo fitoquímico e avaliação da atividade antioxidante [dissertation]**. Belo Horizonte: Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia. Universidade Federal de Minas Gerais, 2009.
- BARETTA, I. P.; ANDREATINI, R. “**Efeito tipo ansiolítico e antidepressivo do extrato bruto hidroalcoólico de Achillea millefolium L (Asteraceae) em modelos animais**” [Thesis]. Curitiba-PR: Programa de Pós- graduação em Farmacologia do Setor de Ciências Biológicas. Universidade Federal do Paraná, 2012.
- BARNETT, S. A. Physiological effects of social stress in wild rats. **Psychosom Res**, v. 3, n. 1, p. 1–11, 1958.
- BARNETT, S. A. Social stress. The concept of stress. In: CARTHY, J.; DUDDINGTON, C. L. (Eds.). **Viewpoints in biology**. London: Butterworth, 1964. p. 170–218.
- BARTLANG, M. S. *et al.* Time matters: Pathological effects of repeated psychosocial stress during the active, but not inactive, phase of male mice. **Journal of Endocrinology**, v. 215, n. 3, p. 425–437, 2012.
- BEISSERT, S.; SCHWARZ, A.; SCHWARZ, T. Regulatory T cells. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 126, n. 1, p. 15–24, 2006.
- BELMAKER, R. H. Bipolar Disorder. **The new england journal of medicine**, v. 351, n. 7, p. 476–486, 2004.
- BELMAKER, R. H.; AGAM, G. Major depressive disorder. **N Engl J Med**, v. 358, n. 1, p. 55–68, 2008.
- BELPOMME, D. *et al.* The multitude and diversity of environmental carcinogens. **Environmental Research**, v. 105, n. 3, p. 414–429, 2007.
- BENIGNI, R. Social sexual inequality and sex difference in cancer incidence. **Environmental Research**, v. 104, n. 1, p. 128–134, 2007.
- BENIGNI, R.; BOSSA, C. Mechanisms of chemical carcinogenicity and mutagenicity: A review with implications for predictive toxicology. **Chemical Reviews**, v. 111, n. 4, p. 2507–2536, 2011.
- BERGAMI, M. *et al.* Deletion of TrkB in adult progenitors alters newborn neuron integration into hippocampal circuits and increases anxiety-like behavior. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, p. 15570–15575, 2008.
- BERGER, A. *et al.* Healthcare utilization and costs in patients beginning

pharmacotherapy for generalized anxiety disorder: a retrospective cohort study. **BMC Psychiatry**, v. 11, p. 193, 2011.

BERTON, O. *et al.* Essential Role of BDNF in the Mesolimbic Dopamine Pathway in Social Defeat Stress. **Science**, v. 311, p. 864–868, 2006.

BERTON, O.; NESTLER, E. J. New approaches to antidepressant drug discovery: Beyond monoamines. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 7, n. 2, p. 137–151, 2006.

BHASKAR, A. *et al.* Expression of measles virus nucleoprotein induces apoptosis and modulates diverse functional proteins in cultured mammalian cells. **PLoS ONE**, v. 6, n. 4, 2011.

BIAVATTI, M. W. *et al.* Preliminary studies on *Campomanesia xanthocarpa* (Berg.) and *Cuphea carthagenensis* (Jacq.) J.F. Macbr. aqueous extract: Weight control and biochemical parameters. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 93, n. 2–3, p. 385–389, 2004.

BIELAJEW, C. *et al.* Strain and Gender Specific Effects in the Forced Swim Test: Effects of Previous Stress Exposure. **Stress**, v. 6, n. 4, p. 269–280, 2003.

BISHOP, K. S. *et al.* An investigation into the association between DNA damage and dietary fatty acid in men with prostate cancer. **Nutrients**, v. 7, n. 1, p. 405–422, 2015.

BLENDY, J. A. The Role of CREB in Depression and Antidepressant Treatment. **Biological Psychiatry**, v. 59, n. 12, p. 1144–1150, 2006.

BLIER, P.; BLONDEAU, C. Neurobiological bases and clinical aspects of the use of aripiprazole in treatment-resistant major depressive disorder. **Journal of Affective Disorders**, v. 128, n. SUPPL. 1, p. S3–S10, 2011.

BLIER, P.; DE MONTIGNY, C. Current advances and trends in the treatment of depression. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 15, n. 7, p. 220–226, 1994.

BODEKER, G. *et al.* **WHO global atlas of traditional, complementary and alternative medicine.** Kobe, Japan WHO Library Cataloguing-in-Publication Data, , 2005. Disponível em: <http://www.who.int/iris/handle/10665/43108%5Cnhttp://apps.who.int/iris/handle/10665/43108%5Cnhttp://www.who.int/iris/bitstream/10665/43108/1/9241562862_map.pdf>

BOLLER, K.; SCHIMID, W. Chemical mutagenesis in mammals – Chinese hamster cells as an in vivo test system. Hematological finding after treatment with tenimon. **Humangenetik**, v. 11, p. 34–54, 1970.

BONASSI, S. *et al.* An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans. **Carcinogenesis**, v. 28, n. 3, p. 625–631, 2007.

BONDI, C. O.; JETT, J. D.; MORILAK, D. A. Beneficial effects of desipramine on cognitive function of chronically stressed rats are mediated by alpha1-adrenergic

receptors in medial prefrontal cortex. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 34, n. 6, p. 913–923, 2011.

BONILLA, A. *et al.* Champanones, Yellow Pigments from the Seeds of Champa (*Campomanesia lineatifolia*). **Phytochemistry**, v. 66, n. 1, p. 1736–1740, 2005.

BORDET, R.; THOMAS, P.; DUPUIS, B. Effect of pindolol on onset of action of paroxetine in the treatment of major depression: intermediate analysis of a double-blind, placebo-controlled trial. Réseau de Recherche et d'Expérimentation Psychopharmacologique. **The American journal of psychiatry**, v. 155, p. 1346–1351, 1998.

BORSINI, F.; MELI, A. Is the forced swimming test a suitable model for revealing antidepressant activity? **Psychopharmacology**, v. 94, n. 2, p. 147–160, 1988.

BORSINI, F.; PODHORNA, J.; MARAZZITI, D. Do animal models of anxiety predict anxiolytic-like effects of antidepressants? **Psychopharmacology**, v. 163, n. 2, p. 121–141, 2002.

BRAMBILLA, G.; MARTELLI, A. Update on genotoxicity and carcinogenicity testing of 472 marketed pharmaceuticals. **Mutation Research - Reviews in Mutation Research**, v. 681, n. 2–3, p. 209–229, 2009.

BROEKKAMP, C. L. *et al.* Major tranquilizers can be distinguished from minor tranquilizers on the basis of effects on marble burying and swim-induced grooming in mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 126, n. 3, p. 223–229, 1986.

BRUCE, S. E. *et al.* Influence of psychiatric comorbidity on recovery and recurrence in generalized anxiety disorder, social phobia, and panic disorder: a 12-year prospective study. **Am J Psychiatry**, v. 162, n. 6, p. 1179–87, 2005.

BRYDON, L. *et al.* Peripheral Inflammation is Associated with Altered Substantia Nigra Activity and Psychomotor Slowing in Humans. **Biological Psychiatry**, v. 63, n. 11, p. 1022–1029, 2008.

BTS (BRITISH TOXICOLOGY SOCIETY). A new approach to the classification of substances and preparations on the basis of their acute toxicity. A report by the British Toxicology Society working party on toxicity. **Hum Toxicol**, v. 3, p. 85–92, 1984.

BURLINSON, B. *et al.* Fourth International Workgroup on Genotoxicity testing: Results of the in vivo Comet assay workgroup. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 627, n. 1, p. 31–35, 2007.

CAKMAK-DEMIRCIGIL, G.; EMERCE, E.; ULUTAS, O. K. Genotoxicity tests from biomarker studies to the regulations: National perspective. **Fabad Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 34, n. 4, p. 217–232, 2009.

CALABRESE, E. J.; BALDWIN, L. A. The hormetic dose-response model is more common than the threshold model in toxicology. **Toxicological Sciences**, v. 71, n. 2, p. 246–250, 2003.

- CALABRESE, E. J.; BALDWIN, L. A.; HOLLAND, C. D. Hormesis: A highly generalizable and reproducible phenomenon with important implications for risk assessment. **Risk Analysis**, v. 19, n. 2, p. 261–281, 1999.
- CALINISAN, J. H. *et al.* Human papillomavirus and blastocyst apoptosis. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 19, n. 3, p. 132–136, 2002.
- CALIXTO, J. B. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America: A personal view. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, n. 1–2, p. 131–134, 2005.
- CALIXTO, J. B.; SIQUEIRA-JR, J. M. Desenvolvimento de Medicamentos no Brasil: Desafios. **Gazeta Médica da Bahia**, v. 78, n. 1, p. 98–106, 2008.
- CAMMERER, Z.; ELHAJOUJI, A.; SUTER, W. In vivo micronucleus test with flow cytometry after acute and chronic exposures of rats to chemicals. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 626, n. 1–2, p. 26–33, 2007.
- CAO, L. *et al.* VEGF links hippocampal activity with neurogenesis, learning and memory. **Nature Genetics**, v. 36, n. 8, p. 827–835, 2004.
- CAPURON, L. *et al.* Does cytokine-induced depression differ from idiopathic major depression in medically healthy individuals? **Journal of Affective Disorders**, v. 119, n. 1–3, p. 181–185, 2009.
- CARDOSO, C. A. L. *et al.* Avaliação da atividade antioxidante, toxicidade e composição química por CG-EM do extrato hexânico das folhas de *Campomanesia pubescens*. **Revista de Ciências Farmacéuticas Básica e Aplicada**, v. 29, n. 3, p. 297–301, 2008.
- CARDOSO, C. A. L. *et al.* Antimicrobial Activity of the Extracts and Fractions of Hexanic Fruits of *Campomanesia* Species (Myrtaceae). **Journal of Medicinal Food**, v. 13, n. 5, p. 1273–1276, 2010.
- CARHART-HARRIS, R. L. *et al.* Psilocybin with psychological support for treatment-resistant depression: an open-label feasibility study. **The Lancet Psychiatry**, v. 3, n. 7, p. 619–627, 2016.
- CARRASCO, F. R. *ET AL.* Immunomodulatory activity of *Zingiber officinale* Roscoe, *Salvia officinalis* L. and *Syzygium aromaticum* L. essential oils: evidence for humor- and cell-mediated responses. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 61, n. 7, p. 961–967, 2009.
- CARROLL, B. J. *et al.* Pathophysiology of hypercortisolism in depression. **Acta Psychiatrica Scandinavica**, v. 115, n. SUPPL. 433, p. 90–103, 2007.
- CARVALHO, L. A.; PARIANTE, C. M. In vitro modulation of the glucocorticoid receptor by antidepressants. **Stress**, v. 11, n. 6, p. 411–424, 2008.
- CASTRÉN, E.; VÕIKAR, V.; RANTAMÄKI, T. Role of neurotrophic factors in depression. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 7, n. 1, p. 18–21, 2007.
- ÇELIK, A. *et al.* In vitro genotoxicity of fipronil sister chromatid exchange, cytokinesis

block micronucleus test, and comet assay. **DNA and cell biology**, v. 33, n. 3, p. 148–54, 2014.

CHAKI, S. *et al.* MGS0039: A potent and selective group II metabotropic glutamate receptor antagonist with antidepressant-like activity. **Neuropharmacology**, v. 46, n. 4, p. 457–467, 2004.

CHARAMES, G.; BAPAT, B. Genomic instability and cancer. **Current Molecular Medicine**, v. 3, n. 7, p. 589–96, 2003.

CHARTOFF, E. H. *et al.* Desipramine Reduces Stress-Activated Dynorphin Expression and CREB Phosphorylation in NAc Tissue. **Molecular Pharmacology**, v. 75, n. 3, p. 704–712, 2009.

CHEN, J. H.; HALES, C. N.; OZANNE, S. E. DNA damage, cellular senescence and organismal ageing: Causal or correlative? **Nucleic Acids Research**, v. 35, n. 22, p. 7417–7428, 2007.

CHEN, Q. *et al.* Elevated cholecystokinergic tone constitutes an important molecular/neuronal mechanism for the expression of anxiety in the mouse. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 10, p. 3881–6, 2006.

CHOJNACKA-WÓJCIK, E.; KŁODZINSKA, A.; PILC, A. Glutamate receptor ligands as anxiolytics. **Curr Opin Investig Drugs**, v. 2, p. 1112–1119, 2001.

CHRISTENSEN, T.; BISGAARD, C. F.; WIBORG, O. Biomarkers of anhedonic-like behavior, antidepressant drug refractoriness, and stress resilience in a rat model of depression. **Neuroscience**, v. 196, p. 66–79, 2011.

CHUANG, C. H.; HU, M. L. Use of whole blood directly for single-cell gel electrophoresis (comet) assay in vivo and white blood cells for in vitro assay. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 564, n. 1, p. 75–82, 2004.

CIMINO, M. C. Comparative Overview of Current International Strategies and Guidelines for Genetic Toxicology Testing for Regulatory Purposes. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 47, p. 362–390, 2006.

CIPRIANI, A. *et al.* Comparative efficacy and acceptability of 12 new-generation antidepressants: a multiple-treatments meta-analysis. **The Lancet**, v. 373, n. 9665, p. 746–758, 2009.

CLEARE, J. A. Biological models of unipolar depression. In: **Power M (ed) Mood disorders: a handbook of science and practice**. Chichester: John Wiley & Sons, 2004. p. 29–46.

COECKE, S. *et al.* On, Guidance on good cell culture practice. a report of the second ECVAM task force good cell culture practice. **Altern. Lab. Anim**, v. 33, n. 3, p. 261–287, 2005.

- COLLINS, A. *et al.* The comet assay as a tool for human biomonitoring studies: The ComNet Project. **Mutation Research - Reviews in Mutation Research**, v. 759, n. 1, p. 27–39, 2014.
- COLLINS, A. R. *et al.* The comet assay: Topical issues. **Mutagenesis**, v. 23, n. 3, p. 143–151, 2008.
- COLLINS, A. R. The comet assay: A heavenly method! **Mutagenesis**, v. 30, n. 1, p. 1–4, 2015.
- COLLINS, A. R.; DUŠINSKÁ, M.; HORSKÁ, A. Detection of alkylation damage in human lymphocyte DNA with the comet assay. **Acta Biochimica Polonica**, v. 48, n. 3, p. 611–614, 2001.
- COOK, P. R.; BRAZELL, I. A. Characterization of nuclear structures containing superhelical DNA. v. 324, p. 303–324, 1976.
- COPPELL, A. L.; PEI, Q.; ZETTERSTRÖM, T. S. C. Bi-phasic change in BDNF gene expression following antidepressant drug treatment. **Neuropharmacology**, v. 44, n. 7, p. 903–910, 2003.
- CORTÉS-GUTIÉRREZ, E. I. *et al.* Evaluation of DNA single and double strand breaks in women with cervical neoplasia based on alkaline and neutral comet assay techniques. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2012, 2012.
- COSYNS, J. P. *et al.* Urothelial lesions in Chinese-herb nephropathy. **American Journal of Kidney Diseases**, v. 33, n. 6, p. 1011–1017, 1999.
- COTELLE, S.; FÉRARD, J. F. Comet assay in genetic ecotoxicology: A review. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 34, n. 4, p. 246–255, 1999.
- COUËDEL, C. *et al.* Collaboration of homologous recombination and nonhomologous end-joining factors for the survival and integrity of mice and cells. **Genes and Development**, v. 18, n. 11, p. 1293–1304, 2004.
- COUILLARD-DESPRES, S. *et al.* Ageing abolishes the effects of fluoxetine on neurogenesis. **Molecular Psychiatry**, v. 14, n. 9, p. 856–864, 2009.
- COUNTRYMAN, P. I.; HEDDLE, J. A. The production of micronuclei from chromosome aberrations in irradiated cultures of human lymphocytes. **Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 41, n. 2–3, p. 321–331, 1976.
- COUPLAND, N. J. *et al.* Decreased prefrontal myo-inositol in major depressive disorder. **Biological Psychiatry**, v. 57, n. 12, p. 1526–1534, 2005.
- COUTINHO, I. D. *et al.* Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS) and evaluation of antioxidant and antimicrobial activities of essential oil of *Campomanesia adamantium* (Cambess.) O. Berg (Guavira). **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 45, n. 4, p. 767–776, 2009.

CRETON, S. *et al.* Acute toxicity testing of chemicals—Opportunities to avoid redundant testing and use alternative approaches. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 40, n. 1, p. 50–83, 2010.

CRONBACH, L.; MEEHL, P. Construct validity in psychological tests. **Psychological bulletin**, v. 129, n. 1, p. 3–9, 1955.

CRYAN, J. F. *et al.* Norepinephrine-deficient mice lack responses to antidepressant drugs, including selective serotonin reuptake inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, n. 21, p. 8186–8191, 2004.

CRYAN, J. F.; HOLMES, A. The ascent of mouse: advances in modelling human depression and anxiety. **Nat Rev Drug Discov**, v. 5, p. 775–790, 2005.

CRYAN, J. F.; HOYER, D.; MARKOU, A. Withdrawal from chronic amphetamine induces depressive-like behavioral effects in rodents. **Biological Psychiatry**, v. 54, n. 1, p. 49–58, 2003.

CRYAN, J. F.; KAUPMANN, K. Don't worry "B" happy!: a role for GABA(B) receptors in anxiety and depression. **Trends Pharmacol Sci**, v. 26, p. 36–43, 2005.

CRYAN, J. F.; MARKOU, A.; LUCKI, I. Assessing antidepressant activity in rodents: recent developments and future needs. **Trends in pharmacological sciences**, v. 23, n. 5, p. 238–245, 2002.

CRYAN, J. F.; MOMBÉREAU, C. In search of a depressed mouse: Utility of models for studying depression-related behavior in genetically modified mice. **Molecular Psychiatry**, v. 9, n. 4, p. 326–357, 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. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 29, n. 4–5, p. 571–625, 2005.

CRYAN, J. F.; SWEENEY, F. F. The age of anxiety: Role of animal models of anxiolytic action in drug discovery. **British Journal of Pharmacology**, v. 164, n. 4, p. 1129–1161, 2011.

CRYAN, J. F.; VALENTINO, R. J.; LUCKI, I. Assessing substrates underlying the behavioral effects of antidepressants using the modified rat forced swimming test. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 29, n. 4–5, p. 547–569, 2005.

CZÉH, B. *et al.* Animal models of major depression and their clinical implications. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 64, p. 293–310, 2016.

D'AQUILA, P. S.; BRAIN, P.; WLLNER, P. Effects of Chronic Mild Stress on Performance in Behavioural Tests Relevant to Anxiety and Depression. **Physiology & Behavior**, v. 56, n. 5, p. 861–867, 1994.

DAL-ZOTTO, S.; MARTÍ, O.; ARMARIO, A. Influence of single or repeated experience

of rats with forced swimming on behavioural and physiological responses to the stressor. **Behavioural Brain Research**, v. 114, n. 1–2, p. 175–181, 2000.

DANG, H. *et al.* Antidepressant effects of ginseng total saponins in the forced swimming test and chronic mild stress models of depression. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 33, n. 8, p. 1417–1424, 2009.

DAVID, D.; KLEMENHAGEN, K.; HOLICK, K. [ORCID]Efficacy of the MCHR1 Antagonist N-[3-(1-([4-(3, 4-difluorophenoxy) phenyl] methyl)(4-piperidyl))-4-methylphenyl]-2-methylpropanamide (SNAP 94847) in mouse models of anxiety and depression following acute. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 321, n. 1, p. 237–248, 2007.

DE FLORA, S.; IZZOTTI, A. Mutagenesis and cardiovascular diseases. Molecular mechanisms, risk factors, and protective factors. **Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 621, n. 1–2, p. 5–17, 2007.

DE PABLO, J. M. *et al.* Learned immobility explains the behavior of rats in the forced swimming test. **Physiology and Behavior**, v. 46, n. 2, p. 229–237, 1989.

DEGEN, G. H. *et al.* Induction of micronuclei with ochratoxin A in ovine seminal vesicle cell cultures. **Archives of Toxicology**, v. 71, n. 6, p. 365–371, 1997.

DEL BO', C. *et al.* Comparison of DNA damage by the comet assay in fresh versus cryopreserved peripheral blood mononuclear cells obtained following dietary intervention. **Mutagenesis**, v. 30, n. 1, p. 29–35, 2015.

DELGADO, P. L. Serotonin Function and the Mechanism of Antidepressant Action. **Archives of General Psychiatry**, v. 47, n. 5, p. 411, 1990.

DELGADO, P. L. *et al.* Monoamines and the mechanism of antidepressant action: effects of catecholamine depletion on mood in patients treated with antidepressants. **Psychopharmacology Bulletin**, v. 29, p. 389–396, 1993.

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. **Biological Psychiatry**, v. 46, n. 2, p. 212–220, 1999.

DELTHEIL, T. *et al.* Behavioral and serotonergic consequences of decreasing or increasing hippocampus brain-derived neurotrophic factor protein levels in mice. **Neuropharmacology**, v. 55, n. 6, p. 1006–1014, 2008.

DENENBERG, V. H. Open-Field Behavior in the Rat: What Does It Mean? **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 159, n. 3, p. 852–859, 1969.

DIAS, D. A.; URBAN, S.; ROESSNER, U. A Historical Overview of Natural Products in Drug Discovery. **Metabolites**, v. 2, n. 4, p. 303–336, 2012.

DICKEY, P. **Toxicity of common household products. A lecture given at “A Small Dose of Toxicology: How Chemicals Affect Your Health,” a conference sponsored**

by the Northwest Center for Occupational . Safety and Health. Washington, DC: [s.n.].

DIMAURO, S. *et al.* Mitochondrial psychiatry. In: DIMAURO, S.; HIRANO, M.; SCHON, E. S. (Eds.). **Mitochondrial medicine**. London: Informa Healthcare, 2006. p. 261–277.

DIMAURO, S.; SCHON, E. A. Mitochondrial Disorders in the Nervous System. **Annual Review of Neuroscience**, v. 31, n. 1, p. 91–123, 2008.

DORATO, M. A.; ENGELHARDT, J. A. The no-observed-adverse-effect-level in drug safety evaluations: Use, issues, and definition(s). **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 42, n. 3, p. 265–274, 2005.

DORON, R. *et al.* A novel herbal treatment reduces depressive-like behaviors and increases BDNF levels in the brain of stressed mice. **Life Sciences**, v. 94, n. 2, p. 151–157, 2014.

DOWLATI, Y. *et al.* Efficacy and tolerability of antidepressants for treatment of depression in coronary artery disease: a meta-analysis. **Canadian Journal of Psychiatry**, v. 55, n. 2, p. 91–99, 2010.

DOWLATSHAHI, D. *et al.* Increased temporal cortex CREB concentrations and antidepressant treatment in major depression. **Lancet**, v. 352, n. 9142, p. 1754–1755, 1998.

DRESCH, D. M. *et al.* Germinação e vigor de sementes de gabioba em função do tamanho do fruto e semente. **Pesquisa Agropecuaria Tropical**, v. 43, n. 3, p. 262–271, 2013.

DREVETS, W. C.; PRICE, J. L.; FUREY, M. L. Brain structural and functional abnormalities in mood disorders: Implications for neurocircuitry models of depression. **Brain Structure and Function**, v. 213, n. 1–2, p. 93–118, 2008.

DRONKERT, M. L. G. *et al.* Mouse RAD54 Affects DNA Double-Strand Break Repair and Sister Chromatid Exchange. **Molecular and Cellular Biology**, v. 20, n. 9, p. 3147–3156, 2000.

DUBOVSKY, S. L.; THOMAS, M. Beyond specificity: Effects of serotonin and serotonergic treatments on psychobiological dysfunction. **Journal of Psychosomatic Research**, v. 39, n. 4, p. 429–444, 1995.

DUDÁŠ, A.; CHOVANEC, M. DNA double-strand break repair by homologous recombination. **Mutation Research - Reviews in Mutation Research**, v. 566, n. 2, p. 131–167, 2004.

DUKE, J. A. Medicinal plants and the pharmaceutical industry. In: JANICK, J.; SIMON, J. E. (Eds.). **New crops**. New York: Wiley, 1993. p. 664–669.

DULAWA, S. C. *et al.* Effects of chronic fluoxetine in animal models of anxiety and

- depression. **Neuropsychopharmacology**, v. 29, n. 7, p. 1321–1330, 2004.
- DUMAN, C. H. *et al.* A Role for MAP Kinase Signaling in Behavioral Models of Depression and Antidepressant Treatment. **Biological Psychiatry**, v. 61, n. 5, p. 661–670, 2007.
- DUMAN, R. S. Pathophysiology of depression: The concept of synaptic plasticity. **European Psychiatry**, v. 17, n. SUPPL. 3, p. 306–310, 2002.
- DUMAN, R. S.; HENINGER, G. R.; NESTLER, E. J. A molecular and cellular theory of depression. **Arch Gen Psychiatry**, v. 54, p. 597–606, 1997.
- DUMAN, R. S.; MONTEGGIA, L. M. A Neurotrophic Model for Stress-Related Mood Disorders. **Biological Psychiatry**, v. 59, n. 12, p. 1116–1127, 2006.
- DUMAN, R. S.; VAIDYA, V. A. Molecular and cellular actions of chronic electroconvulsive seizures. **The Journal of ECT**, v. 14, p. 181–193, 1998.
- DUNLOP, B. W. *et al.* Tiagabine for social anxiety disorder. **Human psychopharmacology**, v. 22, p. 241–244, 2007.
- DUTHIE, S.; HAWDON, A. DNA instability (strand breakage, uracil misincorporation, and defective repair) is increased by folic acid depletion in human lymphocytes in vitro. **FASEB Journal**, v. 12, n. 14, p. 1491–7, 1998.
- DUTHIE, S. J.; COLLINS, A. R. The influence of cell growth, detoxifying enzymes and DNA repair on hydrogen peroxide-mediated DNA damage (measured using the comet assay) in human cells. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 22, n. 4, p. 717–724, 1997.
- EBNER, K.; SARTORI, S.; SINGEWALD, N. Tachykinin Receptors as Therapeutic Targets in Stress-Related Disorders. **Current Pharmaceutical Design**, v. 15, n. 14, p. 1647–1674, 2009.
- EEC. **Council Directive 86/609 EEC of 24 November 1986 on the approximation of laws, regulations and administrative provisions of the Member States regarding the protection of animals used for experimental and other scientific purposes.** Bruxelles: [s.n.].
- EINAT, H. Partial effects of the protein kinase C inhibitor chelerythrine in a battery of tests for manic-like behavior in black Swiss mice. **Pharmacological Reports**, v. 66, n. 4, p. 722–725, 2014.
- EISCH, A. J. *et al.* Brain-derived neurotrophic factor in the ventral midbrain-nucleus accumbens pathway: A role in depression. **Biological Psychiatry**, v. 54, n. 10, p. 994–1005, 2003.
- EKER, A. P. M. *et al.* Direct DNA damage reversal: Elegant solutions for nasty problems. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 66, n. 6, p. 968–980, 2009.
- EKOR, M. The growing use of herbal medicines: Issues relating to adverse reactions and

challenges in monitoring safety. **Frontiers in Neurology**, v. 4, n. 1, p. 1–10, 2014.

EMA, (EUROPEAN MEDICINES AGENCY). **Herbal medicines for human use**. Disponível em: <http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages%2Fmedicines%2Flanding%2Fherbal_search.jsp&mid=WC0b01ac058001fa1d&searchkwByEnter=false&alreadyLoaded=true&isNewQuery=true&keyword=Enter+keywords&searchType=Latin+name+of+the+genus&taxonomyPath=&treeNumber>.

EMA (EUROPEAN MEDICINES AGENCY). **ICH guideline S2 (R1) on Genotoxicity testing and data interpretation for pharmaceuticals intended for human use**. London European Medicines Agency, , 2012. Disponível em: <<http://www.ich.org/products/guidelines/safety/article/safety-guidelines.html>>

EMA (EUROPEAN MEDICINES AGENCY). **European Medicines Agency. Herbal medicines for human use. [Online]**. Disponível em: <http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/regulation/general/general_content_000208.jsp&mid=WC0b01ac05800240cf>. Acesso em: 26 jan. 2018.

ENCISO, J. M. *et al.* Does the duration of lysis affect the sensitivity of the in vitro alkaline comet assay? **Mutagenesis**, v. 30, n. 1, p. 21–28, 2015.

EPA (ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY). **Guidelines for Reproductive Toxicity Risk Assessment**. Washington, DC Environmental Protection Agency, , 1996. Disponível em: <<http://www.epa.gov/raf/publications/guidelines-dev-toxicity-risk-assessment.htm>>

EPA (ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY). **Framework for Cumulative Risk Assessment. EPA/600/P-02/001F**. Washington, DC: [s.n.].

ERNST, E. Toxic heavy metals and undeclared drugs in Asian herbal medicines. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 23, n. 3, p. 136–139, 2002.

ERNST, M. *et al.* The effects of methylphenidate and propranolol on the interplay between induced-anxiety and working memory. **Psychopharmacology**, v. 233, n. 8, p. 3565–3574, 2016.

ESSERS, J. *et al.* Homologous and non-homologous recombination differentially affect DNA damage repair in mice. **The EMBO journal**, v. 19, n. 7, p. 1703–10, 2000.

ESTRADA-CAMARENA, E.; FERNÁNDEZ-GUASTI, A.; LÓPEZ-RUBALCAVA, C. Antidepressant-like effect of different estrogenic compounds in the forced swimming test. **Neuropsychopharmacology**, v. 28, n. 5, p. 830–838, 2003.

ESTRADA-CAMARENA, E.; FERNÁNDEZ-GUASTI, A.; LÓPEZ-RUBALCAVA, C. Interaction between estrogens and antidepressants in the forced swimming test in rats. **Psychopharmacology**, v. 173, n. 1, p. 139–145, 2004.

FAIRBAIRN, D. W.; OLIVE, P. L.; O'NEILL, K. L. The comet assay: a comprehensive review. **Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology**, v. 339, n. 1, p. 37–59,

1995.

FAJEMIROYE, J. O. *et al.* Treatment of anxiety and depression: medicinal plants in retrospect. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. 30, n. 3, p. 198–215, 2016.

FDA (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION). Guidance for industry impurities in drug substances and products: Recommended approaches. **Pharmacology and Toxicology**, n. December, p. 1–16, 2008.

FENECH, M. The in vitro micronucleus technique. **Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 455, n. 1–2, p. 81–95, 2000.

FENECH, M.; MORLEY, A. A. Measurement of micronuclei in lymphocytes. **Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects**, v. 147, n. 1–2, p. 29–36, 1985.

FERNANDEZ, S. P. *et al.* The flavonoid glycosides, myricitrin, gossypin and naringin exert anxiolytic action in mice. **Neurochemical Research**, v. 34, n. 10, p. 1867–1875, 2009.

FERNANDO, A. B. P.; ROBBINS, T. W. Animal Models of Neuropsychiatric Disorders. **Annual Review of Clinical Psychology**, v. 7, n. 1, p. 39–61, 2011.

FERRARI, F.; VILLA, R. F. The Neurobiology of Depression: an Integrated Overview from Biological Theories to Clinical Evidence. **Molecular Neurobiology**, v. 54, n. 7, p. 4847–4865, 2016.

FERRY, S.; BALTASSAT-MILLET, F. La prospection des plantes medicinales. **Lyon Pharmaceutique.**, v. 28, p. 257–260, 1997.

FIELDS, A *et al.* Increased cyclic AMP-dependent protein kinase activity in postmortem brain from patients with bipolar affective disorder. **Journal of neurochemistry**, v. 73, n. 4, p. 1704–1710, 1999.

FILIPSSON, A. F. *et al.* The Benchmark Dose Method - Review of Available Models, and Recommendations for Application in Health Risk Assessment. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 33, n. 5, p. 505–542, 2003.

FIŠAR, Z.; RABOCH, J. Depression, antidepressants, and peripheral blood components. **Neuroendocrinol Lett**, v. 29, p. 17–28, 2008.

FOSTER, D. F. *et al.* Alternative medicine use in older Americans,. **J. Am. Geriatr. Soc.**, v. 48, n. 11, p. 1560–1565, 2001.

FRAGIORGE, E. J. *et al.* Comparative genotoxicity evaluation of imidazolinone herbicides in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 1, p. 393–401, 2008.

FRANKISH, H. 15 million new cancer cases per year by 2020, says WHO. **The Lancet**, v. 361, n. 4, p. 1278, 2003.

FREEMAN, M. P.; FREEMAN, S. A.; MCELROY, S. L. The comorbidity of bipolar and anxiety disorders: prevalence, psychobiology, and treatment issues. **Journal of Affective Disorders**, v. 68, n. 7, p. 1–23, 2002.

FRÖTSCHL, R. Experiences with the in vivo and in vitro comet assay in regulatory testing. **Mutagenesis**, v. 30, n. 1, p. 51–57, 2015.

FUCHS, R. *et al.* Modification of the alkaline comet assay with human mesenchymal stem cells. **Cell Biology International**, v. 36, n. 1, p. 113–117, 2012.

FUJISAKI, C. *et al.* An immunosuppressive drug, cyclosporine-A acts like anti-depressant for rats under unpredictable chronic stress. **Journal of Medical and Dental Sciences**, v. 50, p. 93–100, 2003.

FURR, A.; DANET LAPIZ-BLUHM, M.; MORILAK, D. A. 5-HT_{2A} receptors in the orbitofrontal cortex facilitate reversal learning and contribute to the beneficial cognitive effects of chronic citalopram treatment in rats. **International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 15, n. 9, p. 1295–1305, 2012.

GALDINO, P. M. *et al.* The anxiolytic-like effect of an essential oil derived from *Spiranthera odoratissima* A. St. Hil. leaves and its major component, β -caryophyllene, in male mice. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 38, n. 2, p. 276–284, 2012.

GARCIA, O. *et al.* Measurements of DNA damage on silver stained comets using free Internet software. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 627, n. 2, p. 186–190, 2007.

GARDNER, A.; BOLES, R. G. Is a “Mitochondrial Psychiatry” in the Future? A Review. **Curr Psychiatry Review**, v. 1, n. 3, p. 255–271, 2005.

GARTSIDE, S. E.; UMBERS, V.; SHARP, T. Inhibition of 5HT firing in the 5-, DRN by non-selective 5-HT reuptake inhibitors: studies on the role of Mechanisms, HT1A autoreceptors and noradrenergic. **Psychopharmacology**, v. 130, p. 261–268, 1997.

GEORGE, P. Concerns regarding the safety and toxicity of medicinal plants - An overview. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 1, n. 6, p. 40–44, 2011.

GERSNER, R.; GORDON-KIWKOWITZ, M.; ZANGEN, A. Automated behavioral analysis of limbs' activity in the forced swim test. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 180, n. 1, p. 82–86, 2009.

GEYER, M.; MARKOU, A. Animal models of psychiatric disorders. In: BLOOM, F.; KUPFER, D. J. (Eds.). **Psychopharmacology: the forth generation of progress**. New York: Raven, 1995.

GILBERT, S. G. **An introduction to toxicology. A lecture given at “A Small Dose of Toxicology: How Chemicals Affect Your Health”, A Center, conference sponsored by the Northwest for Occupational Safety and Health**. Washington, DC: [s.n.].

GILBERT, S. G. **A Small Dose of Toxicology. The Health Effects of Common Chemicals.** 2^a ed. Seattle: HWP. Healthy World Press, 2012.

GILHOTRA, N.; DHINGRA, D. Neurochemical modulation of anxiety disorders. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 2, n. SUPPL. 1, p. 1–6, 2010.

GODSCHALK, R. W. L. *et al.* DNA-repair measurements by use of the modified comet assay: An inter-laboratory comparison within the European Comet Assay Validation Group (ECVAG). **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, p. 1–8, 2013.

GOLD, P. W. The organization of the stress system and its dysregulation in depressive illness. **Molecular Psychiatry**, v. 20, n. 6, p. 1-1632–47, 2014.

GOLDBERGE, M. E.; MEAIAN, A. A.; EFRON, D. H. A comparative study of certain pharmacologic responses following acute and chronic administrations of chlordiazepoxide. **Life Sci**, v. 6, p. 481–481, 1967.

GOLLAPUDI, B.; KAMRA, O. Application of a simple giemsa-staining method in the micronucleus test. **Mutat. Res.**, v. 64, p. 45–46, 1979.

GOMES, S. M. *et al.* Anatomia foliar de espécies de Myrtaceae: contribuições à taxonomia e filogenia. **Acta Botanica Brasilica**, v. 23, n. 1, p. 224–238, 2009.

GOMEZ, R. *et al.* Lower in vivo brain extracellular GABA concentration in diabetic rats during forced swimming. **Brain Research**, v. 968, n. 2, p. 281–284, 2003.

GONZÁLEZ BORROTO, J. I. *et al.* The mutagenic potential of the furylethylene derivative 2-furyl-1-nitroethene in the mouse bone marrow micronucleus test. **Toxicological Sciences**, v. 72, n. 2, p. 359–362, 2003.

GOODMAN, J. L. The traditional toxicologic paradigm is correct: Dose influences mechanism. **Environ. Health Persp**, v. 106, n. 1, p. 285–288, 1998.

GOSLING, S. D. From mice to men: What can we learn about personality from animal research? **Psychological Bulletin**, v. 127, n. 1, p. 45–86, 2001.

GOULD, E. *et al.* Regulation of Hippocampal Neurogenesis in Adulthood. **Nature Neuroscience**, v. 3223, n. 0, p. 715–20, 2000.

GOULD, E. How widespread is adult neurogenesis in mammals? **Nature Reviews Neuroscience**, v. 8, n. 6, p. 481–488, 2007.

GRAF, U. *et al.* Somatic Mutation and Recombination Test in *Drosophila melanogaster*. **Environmental Mutagenesis**, v. 6, p. 153–188, 1984.

GRAF, U. Analysis of the relationship between age of larvae at mutagen treatment and frequency and size of spots in the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. **Experientia**, v. 51, n. 2, p. 168–173, 1995.

- GRAF, U.; VAN SCHAİK, N. Improved high bioactivation cross for the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. **Mutation Research**, v. 271, n. 1, p. 59–67, 1992.
- GREEN, T. A. *et al.* Induction of Activating Transcription Factors (ATFs) ATF2, ATF3, and ATF4 in the Nucleus Accumbens and Their Regulation of Emotional Behavior. **Journal of Neuroscience**, v. 28, n. 9, p. 2025–2032, 2008.
- GRESSLER, E.; PIZO, M. A.; MORELLATO, L. P. C. Polinização e dispersão de sementes em Myrtaceae do Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 29, n. 4, p. 509–530, 2006.
- GRIEBEL, G. *et al.* Anxiolytic- and antidepressant-like effects of the non-peptide vasopressin V1b receptor antagonist, SSR149415, suggest an innovative approach for the treatment of stress-related disorders. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, n. 9, p. 6370–6375, 2002.
- GRØNLI, J. *et al.* Chronic mild stress inhibits BDNF protein expression and CREB activation in the dentate gyrus but not in the hippocampus proper. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 85, n. 4, p. 842–849, 2006.
- GUERRERO, F. M. G. *et al.* Investigação da Toxicidade Crônica das Folhas de Guavira (*Campomanesia pubescens*) em Ratos Machos. **Revista Fitos**, v. 5, n. 2, p. 64–72, 2010.
- GUIMARÃES, A. G. *et al.* Antinociceptive and anti-inflammatory effects of the essential oil of *Eugenia candolleana* DC., Myrtaceae, on mice. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 19, n. 4, p. 883–887, 2009.
- GULEC, G.; ISBIL-BUYUKCOSKUN, N.; KAHVECI, N. Effects of centrally-injected glucagon-like peptide-1 on pilocarpine-induced seizures, anxiety and locomotor and exploratory activity in rat. **Neuropeptides**, v. 44, n. 4, p. 285–291, 2010.
- GUNN, J. M. *et al.* Embedding effective depression care: using theory for primary care organisational and systems change. **Implement Sci.**, v. 5, p. 62, 2010.
- HALDER, S. *et al.* Clove Oil Reverses Learning and Memory Deficits in Scopolamine-Treated Mice. **Planta Med**, v. 77, p. 830–834, 2011.
- HAMON, M.; BLIER, P. Monoamine neurocircuitry in depression and strategies for new treatments. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 45, p. 54–63, 2013.
- HANAWALT, P. C.; FORD, J. M.; LLOYD, D. R. Functional characterization of global genomic DNA repair and its implications for cancer. **Mutation Research - Reviews in Mutation Research**, v. 544, n. 2–3, p. 107–114, 2003.
- HANDLEY, S. L.; MITHANI, S. Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of “fear”-motivated behaviour. **Naunyn-Schmiedeberg’s Archives of Pharmacology**, v. 327, n. 1, p. 1–5, 1984.

HANSON, D. Librium. **Chem Eng News**, v. 83, p. 80, 2005.

HANSON, N. D.; OWENS, M. J.; NEMEROFF, C. B. Depression, antidepressants, and neurogenesis: A critical reappraisal. **Neuropsychopharmacology**, v. 36, n. 13, p. 2589–2602, 2011.

HARBONE, J. B.; BEXTER, H.; MOSS, G. P. **Phytochemical dictionary: Handbook of bioactive compounds from plants**. 2^a ed. LONDON: Taylor and Francis, 1999.

HARRO, J. Animals, anxiety, and anxiety disorders: How to measure anxiety in rodents and why. **Behavioural Brain Research**, n. 10, p. 1–13, 2017.

HARTMANN, A. *et al.* Use of the alkaline in vivo Comet assay for mechanistic genotoxicity investigations. **Mutagenesis**, v. 19, n. 1, p. 51–59, 2004.

HARTMANN, A. *et al.* Recommendations for conducting the in vivo alkaline Comet assay. **Mutagenesis**, v. 18, n. 1, p. 45–51, 2003.

HAYASHI, M. *et al.* The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides. **Mutation Research**, v. 245, p. 245–249, 1990.

HAYASHI, M. *et al.* In vivo rodent erythrocyte micronucleus assay. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 312, n. 1, p. 293–304, 1994.

HAYASHI, M. *et al.* In vivo rodent erythrocyte micronucleus assay. II. Some aspects of protocol design including repeated treatments, integration with toxicity testing, and automated scoring. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 35, n. 3, p. 234–252, 2000.

HAYASHI, M. *et al.* In vivo erythrocyte micronucleus assay. III. Validation and regulatory acceptance of automated scoring and the use of rat peripheral blood reticulocytes, with discussion of non-hematopoietic target cells and a single dose-level limit test. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 627, n. 1, p. 10–30, 2007.

HAYASHI, M.; SOFUNI, T.; ISHIDATE, M. An application of Acridine Orange fluorescent staining to the micronucleus test. **Mutation Research Letters**, v. 120, n. 4, p. 241–247, 1983.

HEDDLE, J. A. A rapid in vivo test for chromosomal damage. **Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 18, n. 2, p. 187–190, 1973.

HEIM, K. E.; TAGLIAFERRO, A. R.; BOBILYA, D. J. Flavonoid antioxidants: Chemistry, metabolism and structure-activity relationships. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 13, n. 10, p. 572–584, 2002.

HEMBY, S. E. *et al.* Potential antidepressant effects of novel tropane compounds, selective for serotonin or dopamine transporters. **The Journal of pharmacology and**

experimental therapeutics, v. 282, n. 2, p. 727–33, 1997.

HENNINGSSEN, K. *et al.* Candidate Hippocampal Biomarkers of Susceptibility and Resilience to Stress in a Rat Model of Depression. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 11, n. 7, p. M111.016428, 2012.

HENRY, B. The Effect of Lateral Septum Corticotropin-Releasing Factor Receptor 2 Activation on Anxiety Is Modulated by Stress. **Journal of Neuroscience**, v. 26, n. 36, p. 9142–9152, 2006.

HENRY, J.; STEPHENS, P. M. **Stress, health, and the social environment. A sociobiological approach to medicine.** New York: Springer Verlag, 1977.

HERBERT, J. *et al.* Do corticosteroids damage the brain? **Journal of Neuroendocrinology**, v. 18, n. 6, p. 393–411, 2006.

HEUSER, V. D. *et al.* Influence of age and sex on the spontaneous DNA damage detected by Micronucleus test and Comet assay in mice peripheral blood cells. **Cell Biology International**, v. 32, n. 10, p. 1223–1229, 2008.

HILAKIVI-CLARKE, L. A. *et al.* Behavior of streptozotocin-diabetic mice in tests of exploration, locomotion, anxiety, depression and aggression. **Physiology and Behavior**, v. 48, n. 3, p. 429–433, 1990.

HININGER, I. *et al.* Assessment of DNA damage by comet assay on frozen total blood : method and evaluation in smokers and non-smokers. **Mutation Research**, v. 558, p. 75–80, 2004.

HOBBS, C. A. *et al.* Evaluation of the genotoxicity of the food additive, gum ghatti. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, n. 3–4, p. 854–860, 2012.

HOBBS, D. A.; WARNE, M. S. J.; MARKICH, S. J. Evaluation of criteria used to assess the quality of aquatic toxicity data. **Integrated environmental assessment and management**, v. 1, n. 3, p. 174–180, 2005.

HODEK, P.; TREFIL, P.; STIBOROVÁ, M. Flavonoids-potent and versatile biologically active compounds interacting with cytochromes P450. **Chemico-Biological Interactions**, v. 139, n. 1, p. 1–21, 2002.

HODES, G. E. *et al.* Prozac during puberty: distinctive effects on neurogenesis as a function of age and sex. **Neuroscience**, v. 163, n. 2, p. 609–617, 2009.

HOEIJMAKERS, J. H. J. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. **Nature**, v. 411, n. 6835, p. 366–374, 2001.

HOFFMAN, E. J.; MATHEW, S. J. Anxiety Disorders: A Comprehensive Review of Pharmacotherapies. **Mount Sinai Journal of Medicine**, v. 76, n. 2, p. 248–262, 2008.

HOFFMANN, S. *et al.* A feasibility study developing an integrated testing strategy assessing skin irritation potential of chemicals. **Toxicology Letters**, v. 180, n. 1, p. 9–20, 2008.

HOLLIS, F.; KABBAJ, M. Social defeat as an animal model for depression. **ILAR Journal**, v. 55, n. 2, p. 221–232, 2014.

HOLLY, E. N. *et al.* Sex differences in behavioral and neural cross-sensitization and escalated cocaine taking as a result of episodic social defeat stress in rats. **Psychopharmacology**, v. 224, n. 1, p. 179–188, 2012.

HOLTZHEIMER, P. E.; MAYBERG, H. S. Stuck in a rut: Rethinking depression and its treatment. **Trends in Neurosciences**, v. 34, n. 1, p. 1–9, 2011.

HOOIJMANS, C. R. *et al.* SYRCLE's risk of bias tool for animal studies. **BMC Med. Res. Methodol.**, v. 14, p. 43, 2014.

HORNIK-LURIE, T. *et al.* Use of unconventional therapies by primary care patients - Religious resources vs. complementary or alternative medicine services. **Complementary Therapies in Medicine**, v. 21, n. 5, p. 517–524, 2013.

HOWREN, M. B.; LAMKIN, D. M.; SULS, J. Associations of depression with c-reactive protein, IL-1, and IL-6: A meta-analysis. **Psychosomatic Medicine**, v. 71, n. 2, p. 171–186, 2009.

HUK, A. *et al.* Critical factors to be considered when testing nanomaterials for genotoxicity with the comet assay. **Mutagenesis**, v. 30, n. 1, p. 85–88, 2015.

HULZEBOS, E. *et al.* An Integrated Assessment Scheme for assessing the adequacy of (eco)toxicological data under REACH. **Toxicology Letters**, v. 198, n. 2, p. 255–262, 2010.

IBARGUEN-VARGAS, Y. *et al.* Deficit in BDNF does not increase vulnerability to stress but dampens antidepressant-like effects in the unpredictable chronic mild stress. **Behavioural Brain Research**, v. 202, n. 2, p. 245–251, 2009.

ICHIMARU, Y.; EGAWA, T.; SAWA, A. 5-HT_{1A}-receptor subtype mediates the effect of fluvoxamine, a selective serotonin reuptake inhibitor, on marble-burying behavior in mice. **Japanese journal of pharmacology**, v. 68, p. 65–70, 1995.

IRWIN, M. R.; MILLER, A. H. Depressive disorders and immunity: 20 years of progress and discovery. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 21, n. 4, p. 374–383, 2007.

IWATA, M.; OTA, K. T.; DUMAN, R. S. The inflammasome: Pathways linking psychological stress, depression, and systemic illnesses. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 31, p. 105–114, 2013.

IWGT. **5th International Workshops on Genotoxicity Testing. Pharmazentrum and Biozentrum der Universität Basel.** Switzerland, : [s.n.].

JABŁOŃSKI, M. *et al.* The position of psychooncology in contemporary psychiatry. **Psychiatr. Pol.**, v. 42, n. 5, p. 749–765, 2008.

JACOBSON-PICK, S. *et al.* Social Agonistic Distress in Male and Female Mice: Changes of Behavior and Brain Monoamine Functioning in Relation to Acute and

Chronic Challenges. **PLoS ONE**, v. 8, n. 4, 2013.

JASMINE, R. *et al.* Activity of *Eugenia jambolana*, an ethnomedical plant, against drug-resistant bacteria. **Pharmaceutical Biology**, v. 48, n. 4, p. 405–410, 2010.

JEFFERYS, D.; FUNDER, J. The effect of water temperature on immobility in the forced swimming test in rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 253, n. 1–2, p. 91–94, 1994.

JIANG, W. *et al.* Cannabinoids promote embryonic and adult hippocampus neurogenesis and produce anxiolytic-and antidepressant-like effects. **Journal of Clinical Investigation**, v. 115, n. 11, p. 3104–3116, 2005.

JIN, K. *et al.* Vascular endothelial growth factor (VEGF) stimulates neurogenesis in vitro and in vivo. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 99, n. 18, p. 11946–11950, 2002.

KANAAR, R.; HOEIJMAKERS, J. H.; VAN GENT, D. C. Molecular mechanisms of DNA double-strand break repair. **Trends in Cell Biology**, v. 8, n. 12, p. 483–489, 1998.

KANDEL, E. R. Disorders of mood: Depression, mania and anxiety disorders. In: KANDEL, E.; SCHWARTZ, J.; JESSELL, T. (Eds.). **Principles of neural science**. 4th. ed. New York: McGrawHill, 2000. p. 1209–1255.

KANDEL, E. R. The molecular biology of memory storage: A dialogue between gene and synapses. **Science**, v. 294, n. 5544, p. 1030–1038, 2001.

KASILO, O. M. J.; TRAPSIDA, J.-M. **Decade of African traditional medicine, 2001–2010**. *Afr. Health Mon*, , 2011.

KATZ, R. J. Animal model of depression: pharmacological sensitivity of a hedonic deficit. **Pharmacology Biochemistry & Behavior**, v. 16, p. 965–968, 1982.

KATZ, R. J.; HERSH, S. Amitriptyline and scopolamine in an animal model of depression. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 5, n. 2, p. 265–271, 1981.

KAUFMAN, J. *et al.* Brain-derived neurotrophic factor-5-HTTLPR gene interactions and environmental modifiers of depression in children. **Biological Psychiatry**, v. 59, n. 8, p. 673–680, 2006.

KAYMAZ, N. *et al.* Evidence that patients with single versus recurrent depressive episodes are differentially sensitive to treatment discontinuati. **The Journal of Clinical Psychiatry**, v. 69, p. 1423–1436, 2008.

KEELER, J. F.; ROBBINS, T. W. Translating cognition from animals to humans. **Biochemical Pharmacology**, v. 81, n. 12, p. 1356–1366, 2011.

KELLER, N. R. *et al.* Norepinephrine transporter-deficient mice respond to anxiety producing and fearful environments with bradycardia and hypotension. **Neuroscience**, v. 139, n. 3, p. 931–946, 2006.

KENDLER, K. S.; GARDNER, C. O.; PRESCOTT, C. A. Toward a comprehensive

developmental model for major depression in women. **Am J Psychiatry**, v. 163, p. 115–124, 2006.

KESSLER, R. C. *et al.* The Epidemiology of Major Depressive Disorder Results From the National Comorbidity Survey Replication (NCS-R). **JAMA (reprinted)**, v. 289, n. 23, p. 3095–3105, 2003.

KESSLER, R. C. *et al.* Twelve-month and lifetime prevalence and lifetime morbid risk of anxiety and mood disorders in the United States. **Int J Methods Psychiatr Res.**, v. 21, n. 3, p. 168–184, 2012.

KHAIRNAR, K. *et al.* A simple and novel modification of comet assay for determination of bacteriophage mediated bacterial cell lysis. **Journal of Virological Methods**, v. 203, p. 33–38, 2014.

KIRSCH-VOLDERS, M. *et al.* Report from the in vitro micronucleus assay working group. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 540, n. 2, p. 153–163, 2003.

KLAFKE, J. Z. *et al.* Effects of *Campomanesia xanthocarpa* on biochemical, hematological and oxidative stress parameters in hypercholesterolemic patients. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 127, n. 2, p. 299–305, 2010.

KLAUDE, M. *et al.* The comet assay: Mechanisms and technical considerations. **Mutation Research - DNA Repair**, v. 363, n. 2, p. 89–96, 1996.

KOLA, I.; LANDIS, J. Can the pharmaceutical industry reduce attrition rates? **Nature reviews. Drug discovery**, v. 3, n. August, p. 1–5, 2004.

KOO, J. W.; DUMAN, R. S. IL-1 is an essential mediator of the antineurogenic and anhedonic effects of stress. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 2, p. 751–756, 2008.

KOOLHAAS, J. M. *et al.* Social stress in rats and mice. **Acta Physiol Scand Suppl**, v. 640, p. 69–72, 1997a.

KOOLHAAS, J. M. *et al.* The temporal dynamics of the stress response. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 21, n. 6, p. 775–782., 1997b.

KRISHNA, G.; HAYASHI, M. In vivo rodent micronucleus assay: Protocol, conduct and data interpretation. **Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 455, n. 1–2, p. 155–166, 2000.

KRISHNA, G.; URDA, G.; PAULISSEN, J. Historical vehicle and positive control micronucleus data in mice and rats. **Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 453, n. 1, p. 45–50, 2000.

KRISHNA, G.; URDA, G.; THEISS, J. Principles and practices of integrating genotoxicity evaluation into routine toxicology studies: A pharmaceutical industry perspective. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 32, n. 2, p. 115–120, 1998.

KRISHNAN, V.; NESTLER, E. J. The molecular neurobiology of depression. **Nature**, v. 455, n. 7215, p. 894–902, 2008.

KRONENBERG, G. *et al.* Subpopulations of Proliferating Cells of the Adult Hippocampus Respond Differently to Physiologic Neurogenic Stimuli. **Journal of Comparative Neurology**, v. 467, n. 4, p. 455–463, 2003.

KRUSZEWSKI, M. *et al.* Direct use of the comet assay to study cell cycle distribution and its application to study cell cycle-dependent DNA damage formation. **Mutagenesis**, v. 27, n. 5, p. 551–558, 2012.

KUMAR, C. H. *et al.* Antidiabetic activity of a polyherbal preparation. **Pharmacologyonline**, v. 2, p. 780–787, 2010.

KUMAR, D.; BHAT, Z. A. Apigenin 7-glucoside from *Stachys tibetica* Vatke and its anxiolytic effect in rats. **Phytomedicine**, v. 21, n. 7, p. 1010–1014, 2014.

KUSHWAHA, S. *et al.* Evaluation of multi-organ DNA damage by comet assay from 28 days repeated dose oral toxicity test in mice: A practical approach for test integration in regulatory toxicity testing. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 58, n. 1, p. 145–154, 2010.

KUSKOSKI, E. M. *et al.* Frutos tropicais silvestres e polpas de frutas congeladas: atividade antioxidante, polifenóis e antocianinas. **Ciência Rural**, v. 36, n. 4, p. 1283–1287, 2006.

KUTEEVA, E. *et al.* Galanin, Galanin Receptor Subtypes and Depression-Like Behaviour. In: HÖKFELT, T. (Ed.). **Galanin. Experientia Supplementum**. Springer Basel, 2010. p. 163–181.

LABUZ-ROSZAK, B. *et al.* Quality of life in multiple sclerosis--association with clinical features, fatigue and depressive syndrome. **Psychiatria polska**, v. 47, n. 3, p. 433–441, 2013.

LAMBERT, G. *et al.* Reduced Brain Norepinephrine and Dopamine Release in Treatment-Refractory Depressive Illness. **Archives of General Psychiatry**, v. 57, p. 787–793, 2000.

LANGIE, S. A. S. *et al.* Measuring DNA repair incision activity of mouse tissue extracts towards singlet oxygen-induced DNA damage: A comet-based in vitro repair assay. **Mutagenesis**, v. 26, n. 3, p. 461–471, 2011.

LATINI, S.; PEDATA, F. Adenosine in the central nervous system: Release mechanisms and extracellular concentrations. **Journal of Neurochemistry**, v. 79, n. 3, p. 463–484, 2001.

LEE, L.-F. *et al.* Genomic expression profiling of TNF-alpha-treated BDC2.5 diabetogenic CD4+ T cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 29, p. 10107–12, 2008.

- LENT, E. M. *et al.* Assessment of the in vivo genotoxicity of isomers of dinitrotoluene using the alkaline Comet and peripheral blood micronucleus assays. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 742, n. 1–2, p. 54–60, 2012.
- LESPÉRANCE, F.; FRASURE-SMITH, N. Depression and heart disease. **Cleve Clin J Med**, v. 74, n. 2, p. S63–S66, 2007.
- LEWIS, R. W. *et al.* Recognition of Adverse and Nonadverse Effects in Toxicity Studies. **Toxicologic Pathology**, v. 30, n. 1, p. 66–74, 2002.
- LI, H. T. *et al.* The pharmacological activities of (-)-anonaine. **Molecules**, v. 18, n. 7, p. 8257–8263, 2013.
- LI, Y. *et al.* TrkB Regulates Hippocampal Neurogenesis and Governs Sensitivity to Antidepressive Treatment. **Neuron**, v. 59, n. 3, p. 399–412, 2008.
- LINLEY, S. B.; OLUCHA-BORDONAU, F.; VERTES, R. P. Pattern of distribution of serotonergic fibers to the amygdala and extended amygdala in the rat. **J. Comp. Neurol.**, v. 525, n. 1, p. 1–36, 2017.
- LIU, M. *et al.* The active alkaloids of *Gelsemium elegans* Benth. are potent anxiolytics. **Psychopharmacology**, v. 225, n. 4, p. 839–851, 2013.
- LÓPEZ-MUÑOZ, F.; UCHA-UDABE, R.; ALAMO, C. The history of barbiturates a century after their clinical introduction. **Neuropsychiatric disease and treatment**, v. 1, n. 4, p. 329–43, 2005.
- LÓPEZ-RUBALCAVA, C.; RITTENHOUSE, P. A.; LUCKI, I. **Strain differences in the behavioral effects of antidepressant drugs in the rat forced swimming test.** BAP/EBPS International Workshop on the behavioural pharmacology of anxiety and depression, , 1997.
- LORENZI, H. *et al.* **Frutas brasileiras e exóticas cultivadas (de consumo in natura)**. São Paulo: Instituto Platarum, 2006.
- LORENZI, H.; SOUZA, W. C. **Botânica Sistemática. Guia ilustrado para identificação das família de fanerógamas nativas e exóticas no Brasil**. 2nd. ed Editora Plantarum, 2008.
- LOVELL, D. P.; OMORI, T. Statistical issues in the use of the comet assay. **Mutagenesis**, v. 23, n. 3, p. 171–182, 2008.
- LOWTHER, S. *et al.* Brain [3H]cAMP binding sites are unaltered in depressed suicides, but decreased by antidepressants. **Brain Res**, v. 758, p. 223–228, 1997.
- LUCKI, I.; O’LEARY, O. F. Distinguishing roles for norepinephrine and serotonin in the behavioral effects of antidepressant drugs. **The Journal of Clinical Psychiatry**, v. 65 (Suppl., p. 11–24, 2004.
- MACGREGOR, J. T. *et al.* Integration of Cytogenetic Assays With Toxicology Studies. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 25, p. 328–337, 1995.

MACHADO, D. G. *et al.* Antidepressant-like effect of ursolic acid isolated from *Rosmarinus officinalis* L. in mice: Evidence for the involvement of the dopaminergic system. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 103, n. 2, p. 204–211, 2012.

MACHADO, M. *et al.* Effects of essential oils on the growth of *Giardia lamblia* trophozoites. **Natural Product Communications**, v. 5, n. 1, p. 137–141, 2010.

MADALOSSO, R. C. *et al.* **Avaliação da toxicidade aguda e da atividade gastroprotetora de extratos de *Campomanesia lineatifolia* Ruiz & Pav. em roedores [dissertation]**. Belo Horizonte: Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia. Universidade Federal de Minas Gerais, 2011.

MADSEN, M. T. *et al.* The effect of MELatonin on Depressive symptoms, Anxiety, Circadian and Sleep disturbances in patients after acute coronary syndrome (MEDACIS): Study protocol for a randomized controlled trial. **Trials**, v. 18, n. 1, p. 1–11, 2017.

MAES, M. Depression is an inflammatory disease, but cell-mediated immune activation is the key component of depression. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 35, n. 3, p. 664–675, 2011.

MALBERG, J. E. *et al.* Chronic antidepressant treatment increases neurogenesis in adult rat hippocampus. **The Journal of Neuroscience**, v. 20, n. 24, p. 9104–9110, 2000.

MALLING, H. V. History of the science of mutagenesis from a personal perspective. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 44, n. 5, p. 372–386, 2004.

MANEV, R.; UZ, T.; MANEV, H. Fluoxetine increases the content of neurotrophic protein S100 β in the rat hippocampus. **European Journal of Pharmacology**, v. 420, n. 2–3, p. 2000–2001, 2001.

MANJI, H. K.; DREVETS, W. C.; CHARNEY, D. S. Cellular Neurobiology of Depression. **Nature**, v. 7, n. 5, p. 541–547, 2001.

MANN, J. J. The Medical Management of Depression. **New England Journal of Medicine**, v. 353, n. 17, p. 1819–1834, 2005.

MARIDASS, M. Composition and anti-inflammatory activity of the essential oil of *Eugenia discifera* (Myrtaceae). **International Journal of Essential Oil Therapeutics**, v. 2, n. 4, p. 163–166, 2008.

MARIN, R. *et al.* Volatile Components and Antioxidant Activity from some Myrtaceous Fruits cultivated in Volatile Components and Antioxidant Activity from. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 27, n. 2, p. 172–177, 2008.

MARKMAN, B. E. O.; BACCHI, E. M.; KATO, E. T. M. Antiulcerogenic effects of *Campomanesia xanthocarpa*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 94, n. 1, p. 55–57, 2004.

MARTIN, M. *et al.* Involvement of CB1 cannabinoid receptors in emotional behaviour. **Psychopharmacology**, v. 159, n. 4, p. 379–387, 2002.

MARTINOWICH, K.; MANJI, H.; LU, B. New insights into BDNF function in depression and anxiety. **Nature Neuroscience**, v. 10, n. 9, p. 1089–1093, 2007.

MAVOURNIN, K. H. *et al.* The in vivo micronucleus assay in mammalian bone marrow and peripheral blood. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. **Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology**, v. 239, n. 1, p. 29–80, 1990.

MCEWEN, B. S. *et al.* The role of adrenocorticoids as modulators of immune function in health and disease: neural, endocrine and immune interactions. **Brain Research Reviews**, v. 23, p. 79–133, 1997.

MCKELVEY-MARTIN, V. J. *et al.* The single cell gel electrophoresis assay (comet assay): A European review. **Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 288, n. 1, p. 47–63, 1993.

MCKINNEY, J. W. T.; BUNNEY, J. W. E. Animal model of depression. I. Review of evidence: implications for research. **Arch Gen Psychiatry**, v. 21, n. 2, p. 240–248, 1969.

MCNAMEE, J. P. *et al.* Comet assay: rapid processing of multiple samples. **Mutation Research**, v. 466, p. 63–69, 2000.

MEYER, J. H. *et al.* Reduced brain norepinephrine and dopamine release in treatment-refractory depressive illness: evidence in support of the catecholamine hypothesis of mood disorders. **Arch Gen Psychiatry**, v. 57, n. 8, p. 787–793, 2000.

MILLER, A. H. Depression and immunity: A role for T cells? **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 24, n. 1, p. 1–8, 2010.

MILLER, A. H.; MALETIC, V.; RAISON, C. L. Inflammation and Its Discontents: The Role of Cytokines in the Pathophysiology of Major Depression. **Biological Psychiatry**, v. 65, n. 9, p. 732–741, 2009.

MILLER, B. *et al.* Comparative evaluation of the in vitro micronucleus test and the in vitro chromosome aberration test: Industrial experience. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 392, n. 1–2, p. 45–59, 1997.

MILLER, B. *et al.* Evaluation of the in vitro micronucleus test as an alternative to the in vitro chromosomal aberration assay: Position of the GUM working group on the in vitro micronucleus test. **Mutation Research - Reviews in Mutation Research**, v. 410, n. 1, p. 81–116, 1998.

MILLER, H. L. *et al.* Clinical and biochemical effects of catecholamine depletion on antidepressant-induced remission of depression. **Archives of general psychiatry**, v. 53, n. 2, p. 117–28, 1996.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Cultivar Web**. Disponível em:

<http://sistemas.agricultura.gov.br/snpc/cultivarweb/cultivares_registradas.php>.

Acesso em: 15 jan. 2018.

MIRSALIS, J. C.; MONFORTE, J. A.; WINEGAR, R. A. Transgenic animal models for measuring mutations in vivo. **Critical reviews in toxicology**, v. 24, n. 3, p. 255–280, 1994.

MIYAMAE, Y. *et al.* Evaluation of a tissue homogenization technique that isolates nuclei for the in vivo single cell gel electrophoresis (comet) assay: A collaborative study by five laboratories. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 418, n. 2–3, p. 131–140, 1998.

MOHAMED, T.; ENDOH, D.; OIKAWA, S. DNA damage of blood lymphocytes and neutrophils in cattle with lymphosarcoma. **Veterinarni Medicina**, v. 56, n. 10, p. 504–509, 2011.

MOLCHANOV, M. L.; GUIMARÃES, F. S. Anxiolytic-like effects of AP7 injected into the dorsolateral or ventrolateral columns of the periaqueductal gray of rats. **Psychopharmacology**, v. 160, n. 1, p. 30–38, 2002.

MOLTENI, R. *et al.* Chronic treatment with fluoxetine up-regulates cellular BDNF mRNA expression in rat dopaminergic regions. **International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 9, n. 3, p. 307–317, 2006.

MONSENY, M. A. *et al.* Poisonous plants: An ongoing problem. **Anales de Pediatría (English Edition)**, v. 82, n. 5, p. 347–353, 2015.

MONTEGGIA, L. M. *et al.* Essential role of brain-derived neurotrophic factor in adult hippocampal function. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 29, p. 10827–32, 2004.

MONTGOMERY, S. A. *et al.* Which antidepressants have demonstrated superior efficacy? A review of the evidence. **International clinical psychopharmacology**, v. 22, n. 6, p. 323–329, 2007.

MORETTI, A.; GORINI, A.; VILLA, R. F. Affective disorders, antidepressant drugs and brain metabolism. **Molecular Psychiatry**, v. 8, n. 9, p. 773–785, 2003.

MORILAK, D. A. *et al.* Role of brain norepinephrine in the behavioral response to stress. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 29, n. 8, p. 1214–1224, 2005.

MOTA, K. S. DE L. *et al.* Flavonoids with gastroprotective activity. **Molecules**, v. 14, n. 3, p. 979–1012, 2009.

MOURGUES, S.; LOMAX, M. E.; O'NEILL, P. Base excision repair processing of abasic site/single-strand break lesions within clustered damage sites associated with XRCC1 deficiency. **Nucleic Acids Research**, v. 35, n. 22, p. 7676–7687, 2007.

MOY, S.; NIKOLOVA, V.; RIDDICK, N. **Mouse Behavioral Phenotyping Core. The Carolina Institute for Developmental Disabilities**. Disponível em: <<http://www.cidd.unc.edu/research/default.aspx?id=25>>. Acesso em: 26 jan. 2018.

- MUKHERJEE, P. W. **Quality Control of Herbal Drugs: An Approach to Evaluation of Botanicals**. New Delhi, India: Business Horizons Publishers, 2002.
- MULLER, H. The production of mutations by X rays. **Proc. Natl. Acad. Sci.1 U.S.A.**, v. 68, p. 714–726, 1928.
- NADIN, S. B.; VARGAS-ROIG, L. M.; CIOCCA, D. R. A silver staining method for single-cell gel assay. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 49, n. 9, p. 1183–1186, 2001.
- NAGARATHNA, P. K. M. *et al.* Review on genotoxicity, its molecular mechanisms and prevention. **International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research**, v. 22, n. 1, p. 236–243, 2013.
- NATARAJAN, A. T. Mechanisms for induction of mutations and chromosome alterations. **Environmental Health Perspectives**, v. 101, n. SUPPL. 3, p. 225–229, 1993.
- NAVARRETE, M. H. *et al.* A fast comet assay variant for solid tissue cells. The assessment of DNA damage in higher plants. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 389, n. 2–3, p. 271–277, 1997.
- NEMEROFF, C. B.; VALE, W. W. The neurobiology of depression: inroads to treatment and new drug discovery. **J Clin Psychiatry**, v. 66, p. 5–13, 2005.
- NERI, M. *et al.* Worldwide interest in the comet assay: A bibliometric study. **Mutagenesis**, v. 30, n. 1, p. 155–163, 2015.
- NEUMEISTER, A.; DAHER, R. J.; CHARNEY, D. S. Anxiety disorders: noradrenergic neurotransmission. **Handbook Exp Pharmacol**, v. 169, p. 205–223, 2005.
- NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K. M. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. **Journal of Natural Products**, v. 66, n. 7, p. 1022–1037, 2003.
- NEWTON, S. S. *et al.* Inhibition of cAMP response element-binding protein or dynorphin in the nucleus accumbens produces an antidepressant-like effect. **The Journal of Neuroscience**, v. 22, n. 24, p. 10883–10890, 2002.
- NIBUYA, M.; MORINOBU, S.; DUMAN, R. S. Regulation of BDNF and trkB mRNA in rat brain by chronic electroconvulsive seizure and antidepressant drug treatments. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 15, n. 11, p. 7539–7547, 1995.
- NIBUYA, M.; NESTLER, E. J.; DUMAN, R. S. Chronic antidepressant administration increases the expression of cAMP response element binding protein (CREB) in rat hippocampus. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 16, n. 7, p. 2365–2372, 1996.
- NINAN, T. P. Dissolving the burden of generalized anxiety disorder. **J. Clin. Psychiatry**, v. 62, n. 5, 2002.

NJUNG'E, K.; HANDLEY, S. L. Evaluation of marble-burying behavior as a model of anxiety. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 38, n. 1, p. 63–67, 1991.

NOROOZI, M. *et al.* Effects of flavonoids and vitamin C on oxidative DNA damage to human lymphocytes. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 67, n. 6, p. 1210–1218, 1998.

NORPPA, H.; FALCK, G. C. M. What do human micronuclei contain? **Mutagenesis**, v. 18, n. 3, p. 221–233, 2003.

NOUSPIKEL, T. Nucleotide excision repair: Variations on versatility. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 66, n. 6, p. 994–1009, 2009.

NRC (NATIONAL RESEARCH COUNCIL). **Estimating Public Health Benefits of Proposed Air Pollution Regulations**. Washington, DC: [s.n.].

NRC (NATIONAL RESEARCH COUNCIL). **Toxicity testing in the 21st century: a vision and strategy**. Washington, DC.: [s.n.].

OECD. **OECD Guideline for Testing of Chemicals. N° 401: Acute Oral Toxicity**. Paris Organisation for Economic Co-operation and Development, , 1987. Disponível em: <http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-401-acute-oral-toxicity_9789264040113-en;jsessionid=1c4h6pdgxaolt.x-oecd-live-03>

OECD. **Guidance document on the recognition, assessment, and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation**. Paris Organisation for Economic Co-operation and Development, , 2000.

OECD. **OECD Guideline for Testing of Chemicals. N° 420: Acute Oral Toxicity - Fixed Dose Procedure**. Paris Organisation for Economic Co-operation and Development, , 2001a. Disponível em: <http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-420-acute-oral-toxicity-fixed-dose-procedure_9789264070943-en>

OECD. **OECD Guideline for Testing of Chemicals. N° 423: Acute Oral toxicity - Acute Toxic Class Method**. Paris Organisation for Economic Co-operation and Development, , 2001b. Disponível em: <http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-423-acute-oral-toxicity-acute-toxic-class-method_9789264071001-en>

OECD. **Guidance document on acute oral toxicity testing. Series on Testing and Assessment** Paris Organisation for Economic Co-operation and Development, , 2001c. Disponível em: <[http://www.oecd.org/officialdocuments/displaydocumentpdf?cote=env/jm/mono\(2010\)46&doclanguage=en](http://www.oecd.org/officialdocuments/displaydocumentpdf?cote=env/jm/mono(2010)46&doclanguage=en)>

OECD. **Oecd Guidelines for the Testing of Chemicals. Test N°. 425: Acute Oral Toxicity: Up-and-Down Procedure**. Paris Organisation for Economic Co-operation and Development, , 2008a. Disponível em: <http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-425-acute-oral-toxicity-up-and-down-procedure_9789264071049-en;jsessionid=1c4h6pdgxaolt.x-oecd-live-03>

OECD. **Oecd Guidelines for the Testing of Chemicals. Test N° 407: Repeated dose 28-day oral toxicity study in rodents.** Paris Organisation for Economic Co-operation and Development, , 2008b.

OECD. **Oecd Guideline for the testing of chemicals. N° 489: In Vivo Mammalian Alkaline Comet Assay.** Paris, 2016a.

OECD. **OECD Guideline for the testing of chemicals. N° 474: Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test** Paris, 2016b.

OGA, S.; CAMARGO, M. M. A.; BASTIUZZO, J. A. O. **Fundamentos de toxicologia.** 3^a ed. São Paulo: Atheneu, 2008.

OKUGAWA, G. *et al.* Long-term treatment with antidepressants increases glucocorticoid receptor binding and gene expression in cultured rat hippocampal neurones. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 11, n. 11, p. 887–895, 1999.

OLIVEIRA, J. DA S. *et al.* Potencial alelopático de espécies arbóreas nativas do cerrado. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v. 12, p. 7–11, 2012.

ORDWAY, G. A. *et al.* Elevated agonist binding to alpha2-adrenoceptors in the locus coeruleus in major depression. **Biological Psychiatry**, v. 53, n. 4, p. 315–323, 2003.

OSORIO, C. *et al.* Characterization of odor-active volatiles in champa (*Campomanesia lineatifolia* R. & P.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 2, p. 509–516, 2006.

OSTLING, O.; JOHANSON, K. J. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 123, n. 1, p. 291–298, 1984.

OVERSTREET, D. H. *et al.* The Flinders Sensitive Line rat: A selectively bred putative animal model of depression. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 29, n. 4–5, p. 739–759, 2005.

OVERSTREET, D. H. Modeling Depression in Animal Models. In: KOBEISSY, F. H. (Ed.). **Psychiatric Disorders: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology.** Springer Science Business Media, 2012. v. 829p. 125–144.

OVERSTREET, D. H.; KEENEY, A.; HOGG, S. Antidepressant effects of citalopram and CRF receptor antagonist CP-154,526 in a rat model of depression. **European Journal of Pharmacology**, v. 492, n. 2–3, p. 195–201, 2004.

OYEMITAN, I. A. *et al.* Hypnotic, anticonvulsant and anxiolytic effects of 1-nitro-2-phenylethane isolated from the essential oil of *Dennettia tripetala* in mice. **Phytomedicine**, v. 20, n. 14, p. 1315–1322, 2013.

PALANZA, P. Animal models of anxiety and depression: how are females different? **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 25, n. 3, p. 219–233, 2001.

PARÉ, W. P. Open field, learned helplessness, conditioned defensive burying, and

- forced-swim tests in WKY rats. **Physiology and Behavior**, v. 55, n. 3, p. 433–439, 1994.
- PARIANTE, C. M. The glucocorticoid receptor: Part of the solution or part of the problem? **Journal of Psychopharmacology**, v. 20, n. 4 SUPPL., p. 79–84, 2006.
- PARIANTE, C. M.; LIGHTMAN, S. L. The HPA axis in major depression: classical theories and new developments. **Trends in Neurosciences**, v. 31, n. 9, p. 464–468, 2008.
- PAULA, J. A. M. *et al.* Estudo farmacognóstico das folhas de *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) L.R. Landrum - Myrtaceae. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 18, n. 2, p. 265–278, 2008.
- PAVAN, F. R. *et al.* Evaluation of anti-mycobacterium tuberculosis activity of *campomanesia adamantium* (myrtaceae). **Quimica Nova**, v. 32, n. 5, p. 1222–1226, 2009.
- PEIXOTO, N. *et al.* Avaliação do crescimento inicial de populações de gabioba em Ipameri. **Congresso de Ensino, Pesquisa e Extensão da UEPG**, p. 6, 2005.
- PELLEGGRI, V.; GORBI, G.; BUSCHINI, A. Comet assay on daphnia magna in ecogenotoxicity testing. **Aquatic Toxicology**, v. 155, p. 261–268, 2014.
- PELLOW, S. *et al.* Validation of open : closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 14, n. 3, p. 149–167, 1985.
- PEREIRA, M.; ANDREATINI, R. **Avaliação do efeito tipo antidepressivo e antimaniaco da miricitrina em testes animais [Thesis]**. Curitiba-PR: Programa de Pós-graduação em Farmacologia do Setor de Ciências Biológicas. Universidade Federal do Paraná, 2013.
- PEREZ, J. *et al.* Protein kinase A and Rap1 levels in platelets of untreated patients with major depression. **Molecular Psychiatry**, v. 6, n. 1, p. 44–49, 2001.
- PFEIFFER, P.; GOEDECKE, W.; OBE, G. Mechanisms of DNA double-strand break repair and their potential to induce chromosomal aberrations. **Mutagenesis**, v. 15, n. 4, p. 289–302, 2000.
- PFUHLER, S. *et al.* Reduction of use of animals in regulatory genotoxicity testing: Identification and implementation opportunities-Report from an ECVAM workshop. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 680, n. 1–2, p. 31–42, 2009.
- PISTIS, M. *et al.* Delta(9)-tetrahydrocannabinol decreases extracellular GABA and increases extracellular glutamate and dopamine levels in the rat prefrontal cortex: an in vivo microdialysis study. **Brain Research**, v. 948, n. 1–2, p. 155–158, 2002.
- PITA, J. C. L. R. **Avaliação da atividade antitumoral e toxicidade do trachylobano-360 de *Xylopia langsdorffiana* St. Hil. & Tul. (Annonaceae) [dissertation]**. João Pessoa: Programa de pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos). Universidade Federal da Paraíba, 2011.

PITCHOT, W. *et al.* 5-Hydroxytryptamine 1A receptors, major depression, and suicidal behavior. **Biological Psychiatry**, v. 58, n. 11, p. 854–858, 2005.

PITTENGER, C.; DUMAN, R. S. Stress, depression, and neuroplasticity: A convergence of mechanisms. **Neuropsychopharmacology**, v. 33, n. 1, p. 88–109, 2008.

PLANTAS DO CERRADO. Disponível em: <<https://plantasdocerrado.wordpress.com/?s=gabiroba>>. Acesso em: 16 jan. 2018.

POELCHEN, W. *et al.* Co-transmitter function of ATP in central catecholaminergic neurons of the rat. **Neuroscience**, v. 102, n. 3, p. 593–602, 2001.

POLTER, A. M.; LI, X. 5-HT1A receptor-regulated signal transduction pathways in brain. **Cellular Signalling**, v. 22, n. 10, p. 1406–1412, 2010.

PONCE, R. **How chemicals attack cells. A Toxicology: lecture given at “A Small Dose of How Chemicals Affect Your Health”, a conference sponsored by the Northwest Center for Occupational Safety and Health.** Washington, DC: [s.n.].

PORSOLT, R. D.; BERTIN, A.; JALFRE, M. Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. *Archives internationales de pharmacodynamie et de therapie*. **Archives internationales de pharmacodynamie et de therapie**, v. 229, p. 327–336, 1977.

PORSOLT, R. D.; LE PICHON, M.; JALFRE, M. D. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. **Nature**, v. 266, p. 730–732, 1977.

PORTELLA, M. J. *et al.* Can we really accelerate and enhance the selective serotonin reuptake inhibitor antidepressant effect? A randomized clinical trial and a meta-analysis of pindolol in nonresistant depression. **The Journal of clinical psychiatry**, v. 72, p. 962–969, 2011.

POURRUT, B. *et al.* Recommendations for increasing alkaline comet assay reliability in plants. **Mutagenesis**, v. 30, n. 1, p. 37–43, 2015.

PRICE, J. L.; DREVETS, W. C. Neurocircuitry of mood disorders. **Neuropsychopharmacology**, v. 35, n. 1, p. 192–216, 2010.

PRICE, J. L.; DREVETS, W. C. Neural circuits underlying the pathophysiology of mood disorders. **Trends in Cognitive Sciences**, v. 16, n. 1, p. 61–71, 2012.

RAISON, C. L.; MILLER, A. H. When Not Enough Is Too Much: The Role of Insufficient Glucocorticoid Signaling in the Pathophysiology of Stress Related Disorders. **Am J Psychiatry**, v. 160, p. 1554–1565, 2003.

RAJKOWSKA, G. Postmortem studies in mood disorders indicate altered numbers of neurons and glial cells. **Biological Psychiatry**, v. 48, n. 8, p. 766–777, 2000.

RANDALL, L. O. Pharmacology of methaminodiazepoxide. **Dis Nerv Syst**, v. 21, p. 7–10, 1960.

- RAYNOR, D. K. *et al.* Buyer beware? Does the information provided with herbal products available over the counter enable safe use? **BMC Medicine**, v. 9, n. 1, p. 94, 2011.
- REINHOLD, J. A. *et al.* Pharmacological treatment of generalized anxiety disorder. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v. 12, n. 16, p. 2457–2467, 2011.
- RIBAS-MAYNOU, J. *et al.* Comet assay profile of single and double-strand sperm DNA damage in different patient groups. In: **Abstr. 27th Annu. Meet.** Estocolmo: ESHRE, 2011. p. 123.
- RIBAS-MAYNOU, J. *et al.* Human semen cryopreservation: A sperm DNA fragmentation study with alkaline and neutral Comet assay. **Andrology**, v. 2, n. 1, p. 83–87, 2014.
- RIBEIRO, L. Teste do micronúcleo em medula óssea de roedores in vivo. In: RIBEIRO, L.; FÁVERO, D. (Eds.). **Mutagênese Ambiental**. Canoas: ULBRA, 2003. p. 173–200.
- RICKELS, K. *et al.* Amitriptyline in anxious depressed outpatients: a controlled study. **Am J Psychiatry**, v. 131, n. January, p. 25–30, 1974.
- RICKELS, K. *et al.* Antidepressants for the Treatment of Generalized Anxiety Disorder. **Arch Gen Psychiatry**, v. 50, p. 884–895, 1993.
- RIETJENS, I. M. C. M. *et al.* Molecular mechanisms of toxicity of important food-borne phytotoxins. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 49, n. 2, p. 131–158, 2005.
- RITTENHOUSE, P. A. *et al.* Amplified behavioral and endocrine responses to forced swim stress in the Wistar-Kyoto rat. **Psychoneuroendocrinology**, v. 27, n. 3, p. 303–318, 2002.
- ROBERTSON, J. M. *et al.* Nuance and behavioral cogency: How the Visible Burrow System inspired the Stress-Alternatives Model and conceptualization of the continuum of anxiety. **Physiol Behav.** **2015**, v. 146, n. 7, p. 86–97, 2016.
- ROBICHAUD, R. C.; SLEDGE, K. L. The effects of p-chlorophenylalanine on experimentally induced conflict in the rat. **Life Sci**, v. 8, n. 5, p. 965–959, 1989.
- ROCHA, E. O.; MORAIS, S. A. L.; CHANG, R. **Avaliação dos constituintes fenólicos e voláteis, atividade antioxidante e antimicrobiana de *Campomanesia pubescens* (DC.) O. Berg (Gabioba) [dissertation]**. Uberlândia-MG: Programa de Pós-graduação do Instituto de Química. Universidade Federal de Uberlândia, 2011.
- RODRICKS, J. V. Hormesis and toxicological risk assessment. **Toxicological Sciences**, v. 71, n. 2, p. 134–136, 2003.
- ROJAS, E.; LOPEZ, M. C.; VALVERDE, M. Single cell gel electrophoresis assay: Methodology and applications. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v. 722, n. 1–2, p. 225–254, 1999.
- ROONEY, A. A. *et al.* Systematic Review and Evidence Integration for Literature-Based

Environmental Health Science Assessments. **Environmental Health Perspectives**, v. 122, n. 7, p. 711–719, 2014.

RUHÉ, H. G.; MASON, N. S.; SCHENE, A. H. Mood is indirectly related to serotonin, norepinephrine and dopamine levels in humans: A meta-analysis of monoamine depletion studies. **Molecular Psychiatry**, v. 12, n. 4, p. 331–359, 2007.

RUSH, A. J. *et al.* Is prior course of illness relevant to acute or longer-term outcomes in depressed out-patients? A STAR*D report. **Psychological Medicine**, v. 42, n. 6, p. 1131–1149, 2012.

RUSSO-NEUSTADT, A.; BEARD, R. C.; COTMAN, C. W. Exercise, antidepressant medications, and enhanced brain derived neurotrophic factor expression. **Neuropsychopharmacology: official publication of the American College of Neuropsychopharmacology**, v. 21, n. 5, p. 679–682, 1999.

SAARELAINEN, T. *et al.* Activation of the TrkB neurotrophin receptor is induced by antidepressant drugs and is required for antidepressant-induced behavioral effects. **The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 23, n. 1, p. 349–357, 2003.

SAHOO, N.; MANCHIKANTI, P.; DEY, S. Herbal drugs: Standards and regulation. **Fitoterapia**, v. 81, n. 6, p. 462–471, 2010.

SAIRANEN, M. *et al.* Chronic antidepressant treatment selectively increases expression of plasticity-related proteins in the hippocampus and medial prefrontal cortex of the rat. **Neuroscience**, v. 144, n. 1, p. 368–374, 2007.

SAKS, M. *et al.* Genotoxicity: Mechanisms, Testing Guidelines and Methods. **Global journal of Pharmacy & pharmaceutical Science**, v. 1, n. 5, p. 1–6, 2017.

SALAS, R. *et al.* **Altered anxiety-related responses in mutant mice lacking the beta4 subunit of the nicotinic receptor.** **Journal of neuroscience**, 2003.

SALAS, R. *et al.* Abnormal social behavior in nicotinic acetylcholine receptor β 4 subunit-null mice. **Nicotine & Tobacco Research**, v. 15, n. 5, p. 983–986, 2013.

SAMUEL, G. O. *et al.* Guidance on assessing the methodological and reporting quality of toxicologically relevant studies: A scoping review. **Environment International**, v. 92–93, p. 630–646, 2016.

SAMUELS, B. A.; HEN, R. Neurogenesis and affective disorders. **European Journal of Neuroscience**, v. 33, n. 6, p. 1152–1159, 2011.

SÁNCHEZ, C.; MEIER, E. Behavioral profiles of SSRIs in animal models of depression, anxiety and aggression. Are they all alike? **Psychopharmacology**, v. 129, n. 3, p. 197–205, 1997.

SANG, K. P. *et al.* Par-4 links dopamine signaling and depression. **Cell**, v. 122, n. 2, p. 275–287, 2005.

SANTARELLI, L. *et al.* Genetic and pharmacological disruption of neurokinin 1 receptor function decreases anxiety-related behaviors and increases serotonergic function. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 4, p. 1912–7, 2001.

SANTARELLI, L. *et al.* Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants. **Science**, v. 301, n. 8, p. 805–809, 2003.

SASAKI, K. *et al.* Rosmarinus officinalis polyphenols produce anti-depressant like effect through monoaminergic and cholinergic functions modulation. **Behavioural Brain Research**, v. 238, n. 1, p. 86–94, 2013.

SAVAGE, J. R. Classification and relationships of induced chromosomal structural changes. **Journal of medical genetics**, v. 13, n. 2, p. 103–122, 1976.

SAVITZ, J. B.; DREVETS, W. C. Neuroreceptor imaging in depression. **Neurobiology of Disease**, v. 52, p. 49–65, 2013.

SCHARFMAN, H. *et al.* Increased neurogenesis and the ectopic granule cells after intrahippocampal BDNF infusion in adult rats. **Experimental Neurology**, v. 192, n. 2, p. 348–356, 2005.

SCHLOESSER, R. J. *et al.* Environmental enrichment requires adult neurogenesis to facilitate the recovery from psychosocial stress. **Molecular Psychiatry**, v. 15, n. 12, p. 1152–1163, 2010.

SCHMEDA-HIRSCHMANN, G. Flavonoids from Calycorectes, Campomanesia, Eugenia and Hexachlamys species. **Fitoterapia**, v. 66, p. 373–441, 1995.

SCHMIDT, H. D.; DUMAN, R. S. The role of neurotrophic factors in adult hippocampal neurogenesis, antidepressant treatments and animal models of depressive-like behavior. **Behavioural pharmacology**, v. 18, n. 5–6, p. 391–418, 2007.

SCHMIDT, H. D.; DUMAN, R. S. Peripheral BDNF produces antidepressant-like effects in cellular and behavioral models. **Neuropsychopharmacology**, v. 35, n. 12, p. 2378–2391, 2010.

SCHWARTZ, T. L. *et al.* History repeats itself: pharmacodynamic trends in the treatment of anxiety disorders. **Current pharmaceutical design**, v. 11, n. 2, p. 255–63, 2005.

SCHWEIZER, M. C.; HENNIGER, M. S. H.; SILLABER, I. Chronic mild stress (CMS) in mice: Of anhedonia, “anomalous anxiolysis” and activity. **PLoS ONE**, v. 4, n. 1, 2009.

SCIENLABOR. **SLP 001B - Open Field**. Disponível em: <<http://scienlabor.com.br/produtos/detalhes/1488/open-field---campo-aberto-de-acrilico-branco--base-branca-para-rato.html>>. Acesso em: 26 jan. 2018.

SEDGWICK, B. *et al.* Repair of alkylated DNA: Recent advances. **DNA Repair**, v. 6, n. 4, p. 429–442, 2007.

SEEBERG, E.; EIDE, L.; BJØRÅS, M. The base excision repair pathway. **Trends in**

Biochemical Sciences, v. 20, n. 10, p. 391–397, 1995.

SEGAL, D. S.; KUCZENSKI, R.; MANDEL, A. J. Theoretical implications of drug-induced adaptive regulation for a biogenic amine hypothesis of affective disorders. **Biological Psychiatry**, v. 9, p. 147–159, 1974.

SEKIHASHI, K. *et al.* A comparison of intraperitoneal and oral gavage administration in comet assay in mouse eight organs. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 493, n. 1–2, p. 39–54, 2001.

SEKIHASHI, K. *et al.* Comparative investigation of multiple organs of mice and rats in the comet assay. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 517, n. 1–2, p. 53–75, 2002.

SEPHTON, S. E. *et al.* Depression, cortisol, and suppressed cell-mediated immunity in metastatic breast cancer. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 23, n. 8, p. 1148–1155, 2009.

SERPELONI, J. M.; CÓLUS, I. M. DE S. “Avaliação in vivo e in vitro da citotoxicidade, genotoxicidade e dos efeitos protetores de extratos de plantas medicinais do cerrado brasileiro” [dissertation]. Londrina-PR: Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular. Universidade Estadual de Londrina, 2008.

SHAH, S. U. Importance of genotoxicity & S2a guidelines And, genotoxicity testing for pharmaceuticals. **Iosr Journal of Pharmacy Biological Sciences**, v. 1, n. 2, p. 43–54, 2012.

SHELTON, R. C. The Molecular Neurobiology of Depression. **Psychiatr Clin North Am**, v. 30, n. 1, p. 1–11, 2007.

SHIMAZAKI, T.; YOSHIMIZU, T.; CHAKI, S. Melanin-Concentrating Hormone MCH1 Receptor Antagonists A Potential New Approach to the Treatment of Depression and Anxiety Disorders. **CNS Drugs**, v. 10, p. 801–811, 2006.

SHIMIZU, N.; SHIMURA, T.; TANAKA, T. Selective elimination of acentric double minutes from cancer cells through the extrusion of micronuclei. **Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 448, n. 1, p. 81–90, 2000.

SHIMON, H. *et al.* Reduced frontal cortex inositol levels in postmortem brain of suicide victims and patients with bipolar disorder. **American Journal of Psychiatry**, v. 154, n. 8, p. 1148–1150, 1997.

SHIRAYAMA, Y. *et al.* Brain-derived neurotrophic factor produces antidepressant effects in behavioral models of depression. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 22, n. 8, p. 3251–61, 2002.

SHIRAYAMA, Y.; CHEN, A. C. H.; DUMAN, R. S. Antidepressant-like effects of BDNF and NT-3 in behavioral models of depression. **Abstr Soc Neurosci**, v. 26, p. 1042, 2000.

SHIVELY, C. A.; WILLARD, S. L. Behavioral and neurobiological characteristics of social stress versus depression in nonhuman primates. **Experimental Neurology**, v. 233, n. 1, p. 87–94, 2012.

SHORTER, E.; TYRER, P. Separation of anxiety and depressive disorders: Blind alley in psychopharmacology and classification of disease. **British medical journal**, v. 327, n. 7407, p. 158–160, 2003.

SHRI, R.; BHUTANI, K. K.; SHARMA, A. A new anxiolytic fatty acid from *Aethusa cynapium*. **Fitoterapia**, v. 81, n. 8, p. 1053–1057, 2010.

SILOTE, G. P. *et al.* Infusion of galanin into the mid-caudal portion of the dorsal raphe nucleus has an anxiolytic effect on rats in the elevated T-maze. **Behavioural Brain Research**, v. 252, p. 312–317, 2013.

SILVA, R. M. G. DA *et al.* Antigenotoxic effects of *Mandevilla velutina* (Gentianales, Apocynaceae) crude extract on cyclophosphamide-induced micronuclei in Swiss mice and urethane-induced somatic mutation and recombination in *Drosophila melanogaster*. **Genetics and Molecular Biology**, v. 31, n. 3, p. 751–758, 2008.

SINGH, N. P. *et al.* A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**, v. 175, n. 1, p. 184–191, 1988.

SINGH, N. P. *et al.* A microgel electrophoresis technique for the direct quantitation of DNA damage and repair in individual fibroblasts cultured on microscope slides. **Mutat. Res.**, v. 252, p. 289–296, 1991.

SINITOX. **SINITOX (Sistema Nacional de Informações Tóxico Farmacológicas) [online]. Registros de Intoxicações/ dados nacionais/ 2012.** Disponível em: <<https://sinitox.icict.fiocruz.br/dados-de-agentes-toxicos>>. Acesso em: 5 fev. 2012.

SISODIA, S. S.; BHATNAGAR, M. Hepatoprotective activity of *eugenia jambolana lam.* in carbon tetrachloride treated rats. **Indian Journal of Natural Products and Resources**, v. 8, n. 3, p. 291, 2009.

SIUCIAK, J. A. *et al.* BDNF increases monoaminergic activity in rat brain following intracerebroventricular or intraparenchymal administration. **Brain Research**, v. 710, n. 1–2, p. 11–20, 1996.

SKUTELLA, T. *et al.* **Corticotropin-releasing hormone receptor (type I) antisense targeting reduces anxiety.** **Neuroscience**, 1998.

SLATTERY, D. A.; CRYAN, J. F. The ups and downs of modelling mood disorders in rodents. **ILAR Journal**, v. 55, n. 2, p. 297–309, 2014.

SMITH, M. A. *et al.* Stress and glucocorticoids affect the expression of brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 mRNAs in the hippocampus. **The Journal of neuroscience**, v. 15, n. 3, p. 1768–1777, 1995.

SNYDER, R. D.; GREEN, J. W. A review of the genotoxicity of marketed

pharmaceuticals. **Mutation Research - Reviews in Mutation Research**, v. 488, n. 2, p. 151–169, 2001.

SOARES, J. C.; MALLINGER, A. G. Abnormal phosphatidylinositol (PI)-signalling in bipolar disorder. **Biological Psychiatry**, v. 39, n. 6, p. 461–462, 1995.

SOUSA, J. S. I. *et al.* **Enciclopédia agrícola brasileira: E-H**. Edição Ilu ed. EdUSP, 2004.

SPIVAK, G. New developments in comet-FISH. **Mutagenesis**, v. 30, n. 1, p. 5–9, 2015.

STEIN, D. J.; HOLLANDER, E.; ROTHBAUM, B. O. **Textbook of Anxiety Disorders**. 2nd. ed. Washington, DC and London, England: American Psychiatric Association, 2011. v. 1

STEIN, M.; MILLER, A. H.; TRESTMAN, R. L. Depression, the immune system, and health and illness. Findings in search of meaning. **Arch Gen Psychiatry**, v. 48, p. 171–177, 1991.

STELLJES, M. E. **Toxicology for non-toxicologists**. Rockville, MD: Government Institutes, 2000.

STERNBACH, L. H. The benzodiazepine story. **J Med Chem**, v. 22, p. 1–7, 1979.

STRAWN, J. R.; GERACIOTI, T. D. Noradrenergic dysfunction and the psychopharmacology of posttraumatic stress disorder. **Depression and Anxiety**, v. 25, n. 3, p. 260–271, 2008.

STRÖHLE, A. *et al.* Central and peripheral administration of atriopeptin is anxiolytic in rats. **Neuroendocrinology**, v. 65, n. 3, p. 210–215, 1997.

STRÖHLE, A. *et al.* Anxiolytic activity of atrial natriuretic peptide in patients with panic disorder. **The American journal of psychiatry**, v. 158, n. 9, p. 1514–6, 2001.

SULLIVAN, P. F.; NEALE, M. C.; KENDLER, K. S. Genetic Epidemiology of Major Depression: Review and Meta-Analysis. **American Journal of Psychiatry**, v. 157, n. 10, p. 1552–1562, 2000.

SUN, Y. *et al.* Vascular endothelial growth factor-B (VEGFB) stimulates neurogenesis: Evidence from knockout mice and growth factor administration. **Developmental Biology**, v. 289, n. 2, p. 329–335, 2006.

SURGET, A. *et al.* Drug-Dependent Requirement of Hippocampal Neurogenesis in a Model of Depression and of Antidepressant Reversal. **Biological Psychiatry**, v. 64, n. 4, p. 293–301, 2008.

SURGET, A. *et al.* Corticolimbic transcriptome changes are state-dependent and region-specific in a rodent model of depression and of antidepressant reversal. **Neuropsychopharmacology**, v. 34, n. 6, p. 1363–1380, 2009.

ŠUTIÁKOVÁ, I.; KOVALKOVIČOVÁ, N.; ŠUTIÁK, V. Micronucleus assay in bovine

lymphocytes after exposure to bisphenol A in vitro. **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Animal**, v. 50, n. 6, p. 502–506, 2014.

SVENNINGSSON, P. *et al.* Alterations in 5-HT_{1B} receptor function by p11 in depression-like states. **Science**, v. 311, p. 77–80, 2006.

SWAGEMAKERS, S. M. A. *et al.* The human Rad54 recombinational DNA repair protein is a double-stranded DNA-dependent ATPase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 43, p. 28292–28297, 1998.

SWAPAN, S.; DEY, P. Micronucleus and Its Applications. **Diagnostic cytopathology**, v. 40, n. 1, p. 84–90, 2010.

SZUSTER-CIESIELSKA, A. *et al.* Accelerated apoptosis of blood leukocytes and oxidative stress in blood of patients with major depression. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 32, n. 3, p. 686–694, 2008.

TAKAHASHI, L. K. Role of CRF1 and CRF2 receptors in fear and anxiety. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 25, n. 7–8, p. 627–636, 2001.

TALIAZ, D. *et al.* Knockdown of brain-derived neurotrophic factor in specific brain sites precipitates behaviors associated with depression and reduces neurogenesis. **Molecular Psychiatry**, v. 15, n. 1, p. 80–92, 2010.

TARDITO, D. *et al.* Signaling Pathways Regulating Gene Expression, Neuroplasticity, and Neurotrophic Mechanisms in the Action of Antidepressants: A Critical Overview. **Pharmacol Rev**, v. 58, n. 1, p. 115–134, 2006.

TASAN, R. O. *et al.* The role of Neuropeptide Y in fear conditioning and extinction. **Neuropeptides**, v. 55, p. 111–126, 2016.

TAYLOR, C. B. *et al.* Effects of antidepressant medication on morbidity and mortality in depressed patients after myocardial infarction. **Arch Gen Psychiatry**, v. 62, p. 792–798, 2005.

TAYLOR, D. P.; MOON, S. L. Buspirone and related compounds as alternative anxiolytics. **Neuropeptides**, v. 19, n. SUPPL., p. 15–19, 1991.

TERRADAS, M. *et al.* Genetic activities in micronuclei: Is the DNA entrapped in micronuclei lost for the cell? **Mutation Research - Reviews in Mutation Research**, v. 705, n. 1, p. 60–67, 2010.

TIMMERMAN, W. *et al.* Effects of handling on extracellular levels of glutamate and other amino acids in various areas of the brain measured by microdialysis. **Brain Research**, v. 833, n. 2, p. 150–160, 1999.

TLSTY, T. D. *et al.* Genomic instability and cancer. **Mut. Res.**, v. 337, p. 1–7, 1995.

TOMATIS, L. *et al.* Avoided and avoidable risks of cancer. **Carcinogenesis**, v. 18, n. 1, p. 97–105, 1997.

- TREIT, D.; PINEL, J. P. J.; FIBIGER, H. C. Conditioned defensive burying: A new paradigm for the study of anxiolytic agents. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 15, n. 4, p. 619–626, 1981.
- TREMBLAY, P.; BLIER, P. Catecholaminergic Strategies for the Treatment of Major Depression. **Current Drug Targets**, v. 7, p. 149–158, 2006.
- TRIVEDI, M. H. *et al.* Evaluation of outcomes with citalopram for depression using measurement-based care in STAR*D: Implications for clinical practice. **American Journal of Psychiatry**, v. 163, n. 1, p. 28–40, 2006.
- UMATHE, S. N. *et al.* Neurosteroids modulate compulsive and persistent behavior in rodents: Implications for obsessive-compulsive disorder. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 33, n. 7, p. 1161–1166, 2009.
- UNGER, E. F. All Is Not Well in the World of Translational Research. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 50, n. 8, p. 738–740, 2007.
- UNL (ENVIRONMENTAL HEALTH AND SAFETY). Toxicology and Exposure Guidelines. **University of Nebraska, Lincoln**, n. 402, p. 28, 2002.
- VALLILO, M. I. *et al.* Composição química dos frutos de *Campomanesia adamantium* (Cambessédes) O.Berg. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 4, p. 805–810, 2006.
- VALLILO, M. I. *et al.* Composição química dos frutos de *Campomanesia xanthocarpa* Berg-Myrtaceae. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, p. 231–237, 2008.
- VAN BROEKHOVEN, F.; VERKES, R. J. Neurosteroids in depression: A review. **Psychopharmacology**, v. 165, n. 2, p. 97–110, 2003.
- VAN DEN HEUVEL, M. J. *et al.* The international validation of a fixed dose procedure as an alternative to the classical LD50 test. **Food Chem Toxicol**, v. 28, n. 7, p. 469–482, 1990.
- VAN GENT, D. C.; HOEIJMAKERS, J. H. J.; KANAAR, R. Chromosomal stability and the DNA double-stranded break connection. **Nature Reviews Genetics**, v. 2, n. 3, p. 196–206, 2001.
- VAN GOETHEM, F.; LISON, D.; KIRSCH-VOLDERS, M. Comparative evaluation of the in vitro micronucleus test and the alkaline single cell gel electrophoresis assay for the detection of DNA damaging agents: Genotoxic effects of cobalt powder, tungsten carbide and cobalt-tungsten carbide. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 392, n. 1–2, p. 31–43, 1997.
- VAN LUIJK, J. *et al.* Systematic reviews of animal studies; Missing link in translational research? **PLoS ONE**, v. 9, n. 3, p. 1–5, 2014.
- VAN PRAAG, H.; KEMPERMANN, G.; GAGE, F. H. Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. **Nat Neurosci**, v. 2, n. 3,

p. 266–270, 1999.

VAN STEEG, H. The role of nucleotide excision repair and loss of p53 in mutagenesis and carcinogenesis. **Toxicology Letters**, v. 120, n. 1–3, p. 209–219, 2001.

VAN VLIET, E. Current standing and future prospects for the technologies proposed to transform toxicity testing in the 21st century. **ALTEX: Alternativen zu Tierexperimenten**, v. 28, n. 1, p. 17–44, 2011.

VANHERWEGHEM, J. L.; DEGAUTE, J. P. The policy of admission to the education in medicine and dentistry in the French-speaking community of Belgium. **Acta clinica Belgica**, v. 53, n. 1, p. 2–3, 1998.

VASSOUT, A *et al.* NKP608: a selective NK-1 receptor antagonist with anxiolytic-like effects in the social interaction and social exploration test in rats. **Regulatory peptides**, v. 96, n. 1–2, p. 7–16, 2000.

VASWANI, M.; LINDA, F. K.; RAMESH, S. Role of selective serotonin reuptake inhibitors in psychiatric disorders: a comprehensive review. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 27, n. 1, p. 85–102, 2003.

VEENA, J. *et al.* Exposure to enriched environment restores the survival and differentiation of new born cells in the hippocampus and ameliorates depressive symptoms in chronically stressed rats. **Neuroscience Letters**, v. 455, n. 3, p. 178–182, 2009.

VILLA, R. F.; FERRARI, F.; GORINI, A. Energy metabolism of rat cerebral cortex, hypothalamus and hypophysis during ageing. **Neuroscience**, v. 227, p. 55–66, 2012.

VILLAS-BOAS, G. R.; LACERDA, R. B. DE. **Avaliação do efeito do baclofeno sobre o padrão de consumo de álcool em camundongos submetidos a um modelo de adição [dissertation]**. Curitiba-PR: Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Departamento de Farmacologia, Setor de Ciências Biológicas. Universidade Federal do Paraná, 2011.

VISSER, S. A. G. Neuroactive Steroids Differ in Potency but Not in Intrinsic Efficacy at the GABAA Receptor in Vivo. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 303, n. 2, p. 616–626, 2002.

VOGEL, E. W. *et al.* The results of assays in *Drosophila* as indicators of exposure to carcinogens. **IARC scientific publications**, v. 146, p. 427–470, 1998.

WADA, K. *et al.* Effects of seven chemicals on DNA damage in the rat urinary bladder: A comet assay study. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 769, p. 1–6, 2014.

WAKEFIELD, J. C. *et al.* Extending the bereavement exclusion for major depression to other losses: evidence from the National Comorbidity Survey. **Arch Gen Psychiatry**, v. 64, p. 433–440, 2007.

WALLACE, T. L. *et al.* Effects of cyclic adenosine monophosphate response element binding protein overexpression in the basolateral amygdala on behavioral models of depression and anxiety. **Biological Psychiatry**, v. 56, n. 3, p. 151–160, 2004.

WALTHER, D. J.; BADER, M. A unique central tryptophan hydroxylase isoform. **Biochemical Pharmacology**, v. 66, n. 9, p. 1673–1680, 2003.

WARDEN, D. *et al.* The STAR*D project results: A comprehensive review of findings. **Current Psychiatry Reports**, v. 9, n. 6, p. 449–459, 2007.

WARNER-SCHMIDT, J. L.; DUMAN, R. S. VEGF is an essential mediator of the neurogenic and behavioral actions of antidepressants. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 11, p. 4647–4652, 2007.

WEI, Z. *et al.* Detecting DNA repair capacity of peripheral lymphocytes from cancer patients with UVC challenge test and bleomycin challenge test. **Mutagenesis**, v. 20, n. 4, p. 271–277, 2005.

WEISS, J. M.; KILTS, C. D. Animal models of depression and schizophrenia. In: SCHATZBERG, A. F.; NEMEROFF, C. B. (Eds.). **Textbook of Psychopharmacology**. 2nd. ed. Washington, DC and London, England: American Psychiatric Publishing, 1998. p. 89–131.

WESOLY, J. *et al.* Differential Contributions of Mammalian Rad54 Paralogs to Recombination, DNA Damage Repair, and Meiosis. **MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY**, v. 26, n. 3, p. 976–989, 2006.

WETERINGS, E.; VAN GENT, D. C. The mechanism of non-homologous end-joining: A synopsis of synapsis. **DNA Repair**, v. 3, n. 11, p. 1425–1435, 2004.

WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION). **WHO Traditional Medicine Strategy 2002-2005**. Geneva World Health Organization, , 2002. Disponível em: <http://www.wpro.who.int/health_technology/book_who_traditional_medicine_strategy_2002_2005.pdf>

WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION). **WHO guidelines on safety monitoring of herbal medicines in pharmacovigilance systems**. Geneva World Health Organization, , 2004. Disponível em: <<http://apps.who.int/medicinedocs/documents/s7148e/s7148e.pdf>>

WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION). **WHO Traditional Medicine Strategy 2014-2023**. Geneva World Health Organization, , 2014. Disponível em: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/92455/1/9789241506090_eng.pdf?ua=1> (Accessed 09.09.2016)>

WIBORG, O. Chronic mild stress for modeling anhedonia. **Cell Tissue Res**, n. 6, p. 1–15, 2013.

WIJNHOVEN, S. W. P.; VAN STEEG, H. Transgenic and knockout mice for DNA repair functions in carcinogenesis and mutagenesis. **Toxicology**, v. 193, n. 1–2, p. 171–187,

2003.

WILLIAMSON, E. M.; OKPAKO, D. T.; EVANS, F. J. Selection, preparation and pharmacological evaluation of plant material. **J. Med. Chem**, v. 40, p. 1559–1559, 1996.

WILLNER, P. The validity of animal models of depression. **Psychopharmacology**, v. 83, n. 1, p. 1–16, 1984.

WILLNER, P. *et al.* Reduction of sucrose preference by chronic unpredictable mild stress, and its restoration by a tricyclic antidepressant. **Psychopharmacology**, v. 93, n. 3, p. 358–364, 1987.

WILLNER, P. Animal models of depression: an overview. **Pharmacology & therapeutics**, v. 45, n. 3, p. 425–455, 1990.

WILLNER, P. Validity, reliability and utility of the chronic mild stress model of depression: a 10-year review and evaluation. **Psychopharmacology**, v. 134, n. 4, p. 319–29, 1997.

WILLNER, P. Chronic Mild Stress (CMS) Revisited: Consistency and Behavioural-Neurobiological Concordance in the Effects of CMS. **Neuropsychobiology**, v. 52, n. 7, p. 90–110, 2005.

WILLNER, P.; HALE, A. S.; ARGYROPOULOS, S. Dopaminergic mechanism of antidepressant action in depressed patients. **Journal of Affective Disorders**, v. 86, n. 1, p. 37–45, 2005.

WILLNER, P.; MITCHELL, P. J. Animal models of depression: a diathesis-stress approach. In: D'HAENEN, H.; DEN BOER, H.; WILLNER, P. (Eds.). **Biological Psychiatry**, vol. 2. Wiley, 2002. p. 703–726.

WILLNER, P.; MUSCAT, R.; PAPP, M. Chronic mild stress-induced anhedonia: A realistic animal model of depression. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 16, n. 4, p. 525–534, 1992.

WILLNER, P.; SCHEEL-KRÜGER, J.; BELZUNG, C. The neurobiology of depression and antidepressant action. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 37, n. 10, p. 2331–2371, 2013.

WITTCHEN, H. U. *et al.* Disability and quality of life in pure and comorbid social phobia. Findings from a controlled study. **Eur Psychiatry**, v. 15, n. 1, p. 46–58, 2000.

WONG, D. T.; PERRY, K. W.; BYMASTE, F. P. Case history: the discovery of fluoxetine hydrochloride (Prozac). **Nat Rev Drug Discov**, v. 4, p. 764–774, 2005.

YALCIN, I. *et al.* Effects of 5,7-dihydroxytryptamine lesion of the dorsal raphe nucleus on the antidepressant-like action of tramadol in the unpredictable chronic mild stress in mice. **Psychopharmacology**, v. 200, n. 4, p. 497–507, 2008.

YAN, T. *et al.* DNA mismatch repair (MMR) mediates 6-thioguanine genotoxicity by introducing single-strand breaks to signal a G2-M arrest in MMR-proficient RKO cells.

Clinical Cancer Research, v. 9, n. 6, p. 2327–2334, 2003.

YANKELEVITCH-YAHAV, R. *et al.* The Forced Swim Test as a Model of Depressive-like Behavior. **Journal of Visualized Experiments**, n. 97, p. 1–7, 2015.

YASUHARA, S. *et al.* Comparison of comet assay, electron microscopy, and flow cytometry for detection of apoptosis. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 51, n. 7, p. 873–885, 2003.

YAU, J. L. W. *et al.* The antidepressant desipramine requires the ABCB1 (Mdr1)-type p-glycoprotein to upregulate the glucocorticoid receptor in mice. **Neuropsychopharmacology**, v. 32, n. 12, p. 2520–2529, 2007.

YOSHIMIZU, T.; CHAKI, S. Increased cell proliferation in the adult mouse hippocampus following chronic administration of group II metabotropic glutamate receptor antagonist, MGS0039. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 315, n. 2, p. 493–496, 2004.

YOSHITAKE, T. *et al.* Enhanced hippocampal noradrenaline and serotonin release in galanin-overexpressing mice after repeated forced swimming test. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 1, p. 354–9, 2004.

YUN, H. *et al.* Antimutagenic effects of genistein in drosophila somatic mutation assaying system. **Journal of Korean Association of Cancer Prevention**, v. 5, n. 3, p. 135–143, 2000.

ZARDAWI, I. M. Pheochromocytoma masquerading as anxiety and depression. **American Journal of Case Reports**, v. 14, p. 161–163, 2013.

ZETTERSTRÖM, T. S. C.; PEI, Q.; GRAHAME-SMITH, D. G. Repeated electroconvulsive shock extends the duration of enhanced gene expression for BDNF in rat brain compared with a single administration. **Molecular Brain Research**, v. 57, n. 1, p. 106–110, 1998.

ZHANG, X. *et al.* Loss-of-function mutation in tryptophan hydroxylase-2 identified in unipolar major depression. **Neuron**, v. 45, n. 1, p. 11–16, 2005.

ZHU, Y.; YIN, J. A quantitative comet assay: Imaging and analysis of virus plaques formed with a liquid overlay. **Journal of Virological Methods**, v. 139, n. 1, p. 100–102, 2007.

6. APÊNDICES

6.1. Artigo I: Aspectos farmacológicos, toxicológicos, químicos e culturais da guavira (*Campomanesia pubescens* (D.C.) O. BERG): uma revisão sistemática

Submetido ao periódico “*Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*” (Fator de Impacto 0,296, Qualis B3 na área Medicina II). Data da Submissão: 09/03/2018.

Link com as normas da revista: <http://www.scielo.br/revistas/rbpm/pinstruc.htm>

**Aspectos farmacológicos, toxicológicos, químicos e culturais da guavira
(*Campomanesia pubescens* (D.C.) O. BERG): uma revisão sistemática**

VILLAS-BOAS, G.R.^{1*}; OESTERREICH, S.A.²

¹ Laboratório de Ensaio Toxicológicos. Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Grande Dourados, Rodovia Dourados, Itahum Km 12, Cidade Universitária, Caixa Postal 364, CEP 79804-970, Dourados-MS, Fone 55 (67) 3410-2001. E-mail: gustavo.villasboas@gmail.com*

² Laboratório de Ensaio Toxicológicos. Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Grande Dourados, Rodovia Dourados, Itahum Km 12, Cidade Universitária, Caixa Postal 364, CEP 79804-970, Dourados-MS, Fone 55 (67) 3410-2344. E-mail: silviaoesterreich@gmail.com.

* *Autor para correspondência.*

Resumo: O uso de medicamentos e suplementos à base de plantas aumentou ao longo das últimas três décadas principalmente na atenção primária a saúde. Embora as terapias envolvendo as plantas medicinais sejam promissoras, muitas delas permanecem sem estudos quanto a segurança durante o uso (toxicidade) e eficácia biológica. Ademais, com base nas pesquisas para identificar os fitoconstituintes essas plantas representam fonte de recursos para o desenvolvimento de novas terapias. Esta revisão sistemática sobre o consumo da guavira (*Campomanesia pubescens* (D.C.) O. Berg) tem como objetivo

fornecer embasamento teórico para utilização farmacológica e alimentar desta planta e contribuir para o desenvolvimento científico e econômico das regiões onde ela é encontrada. A revisão foi realizada entre janeiro de 2017 e março de 2018 e foram utilizadas bases de dados e descritores específicos para a busca dos artigos e demais materiais utilizados. A análise da pesquisa sistemática restringiu-se aos artigos em inglês e português, bem como monografias, dissertações de mestrado e teses de doutorado. Foram selecionados trabalhos originais e revisões sistemáticas de literatura que envolveram o gênero *Campomanesia* e a espécie *C. pubescens*. Apesar de ser amplamente consumida pela população, há uma escassez de estudos que comprovem a atividade biológica que justifique o uso etnofarmacológico bem como testes que apontem segurança para consumo humano.

Palavras-chave: guavira, plantas medicinais, toxicidade, atividade biológica, fitoconstituintes.

Abstract: The use of herbal medicines and supplements has increased over the past three decades in primary health care. As therapies involving medicinal plants are promising, many of them permanently unsound as to safety in use (toxicity) and biological efficacy. In addition, based on research to identify phytochemicals, these plants represent a source of resources for the development of new therapies. This systematic review on the consumption of guavira (*Campomanesia pubescens* (D.C.) O. Berg) aims to provide theoretical background for pharmacological and food use of this plant and contribute to the scientific and economic development of the regions where it is found. The review was carried

out between January 2017 and March 2018 and specific databases and descriptors were used to search the articles and other materials used. The analysis of systematic research was restricted to articles in English and Portuguese, as well as monographs, master's dissertations and doctoral theses. Original papers and systematic literature reviews were selected that involved the genus *Campomanesia* and the species *C. pubescens*. Despite being widely consumed by the population, there is a shortage of studies that prove the biological activity that justifies ethnopharmacological use as well as tests that point to safety for human consumption.

Key-words: guavira, medicinal plants, toxicity, biological activity, phytochemicals.

Introdução

Na última década, o uso de plantas medicinais aumentou substancialmente em todo o mundo, seja como fitoconstituintes empregados na medicina tradicional (Harvey, 2000) ou como matéria-prima para a produção de suplementos dietéticos. Além disso, de acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS) entre 70 e 80% da população mundial depende exclusivamente das plantas para seus cuidados primários de saúde (Chan, 2003; Muhammad *et al.*, 2011). Apesar das muitas metodologias existentes para síntese de novos produtos farmacêuticos, as plantas ainda representam as principais fontes para pesquisa de novas identidades moleculares, principalmente porque sintetizam constituintes que são difíceis de obter por meio da síntese química. Os compostos obtidos a partir de fontes naturais também podem servir como

protótipos para a produção de novos medicamentos com atividades biológicas e terapêuticas similares aos de uso corrente ou ser ligeiramente modificados para torná-los mais efetivos e/ou menos tóxicos (Harvey, 2000; Munari *et al.*, 2010; Regner *et al.*, 2011; Turolla & Nascimento, 2006).

Embora séculos de uso tradicional, aparentemente, apoiem uma crença frequentemente equivocada sobre a segurança das plantas medicinais, contrariamente aos medicamentos alopáticos, a toxicidade dos medicamentos fitoterápicos tradicionais não foi completamente avaliada na maioria dos casos e, deste modo, estas plantas podem ser extremamente prejudiciais para a saúde humana. Por exemplo, alguns estudos revelaram que plantas frequentemente usadas em medicina popular são potencialmente genotóxicas (Ananthi *et al.*, 2010; Marques *et al.*, 2003; Melo-Reis *et al.*, 2011; Regner *et al.*, 2011; Shin *et al.*, 2011).

Além de serem utilizadas como medicamentos, as plantas também são amplamente empregadas como alimentos em todo o mundo, seja como especiarias, para amenizar ou mascarar danos nos produtos alimentícios, melhorando sabor e aroma, ou *in natura* e/ou processados na forma de bebidas, geleias, doces, condimentos, entre outros (Carvalho *et al.*, 2010). Sendo assim, o público consumidor das plantas deve conhecer as principais informações de segurança para evitar danos à saúde devido ao seu consumo irracional. Estudo prévio demonstrou que três quartos das preparações a base de plantas medicinais comercializadas não contém informações de segurança para o consumo adequado (Raynor *et al.*, 2011). Apesar do amplo consumo das plantas como medicamentos e alimentos, muitas vezes a utilização desses recursos ocorre sem a devida comprovação científica de suas propriedades

farmacológicas e potencial tóxico, que é realizada por meio de testes pré-clínicos e clínicos (França *et al.*, 2007; Silveira *et al.*, 2008).

As espécies do gênero *Campomanesia*, pertencentes a família *Myrtaceae*, são encontradas na região central do Brasil, no Uruguai, Paraguai e Argentina. No Mato Grosso do Sul é muito utilizada *in natura* e na forma de doces, sorvetes, refrescos, licores e, muitas vezes, como flavorizantes em destilados alcoólicos (Vallilo *et al.*, 2008). Estudos demonstraram que as folhas da espécie *Campomanesia pubescens* (D.C.) O. BERG (guavira), colhidas em áreas nativas de Mato Grosso do Sul (MS), apresentaram efeito anti-inflamatório devido a redução dos monócitos circulantes (Guerrero *et al.*, 2010) e efeito antioxidante frente ao método do β -caroteno/ácido linoleico (Cardoso *et al.*, 2008) e do 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH) (Rocha *et al.*, 2011). Além disso, também é utilizada pela comunidade local com outras finalidades terapêuticas, dentre elas, ação depurativa, antidiarreica e redução dos níveis sanguíneos de colesterol (Ballve *et al.*, 1995).

É evidente a importância e necessidade de pesquisas que promovam a busca e inserção de informações que embasem a utilização segura de determinadas espécies vegetais e fitoterápicos de interesse clínico e nutricional, pois, mesmo que determinada espécie apresente baixa toxicidade, seu uso impróprio associado a fatores de risco, pode provocar quadros graves que, por vezes, são subnotificados (Brasil, 2012). Diante disso, o objetivo do presente estudo é revisar sistematicamente a literatura para ampliar o acesso a informação sobre o consumo da *C. pubescens*, fornecendo uma base segura para a utilização desta planta e, conseqüentemente, contribuindo para o desenvolvimento científico e econômico das regiões onde ela é encontrada.

Método e sistematização da pesquisa

A revisão de literatura foi realizada entre janeiro de 2017 e março de 2018. As bases de dados acessadas foram: 1) *Medline* (Sistema Online de Busca e Análise de Literatura Médica); 2) *Pubmed* (*Public Medline or Publisher Medline*); 3) *Lilacs* (Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde); 4) *Scielo* (*Scientific Eletronic Library Online*). Os descritores utilizados para seleção dos estudos foram: *Campomanesia pubescens*; *Campomanesia pubescens/toxicity*; *Campomanesia pubescens/safety*; *Campomanesia pubescens/pharmacological effects*; *Campomanesia pubescens/genotoxicity*; *Campomanesia pubescens/chemical analysis*; *genus Campomanesia*; *Flavonoids*; *toxicology*; *pharmacology of medicinal plants*; *cometa assay/micronúcleo assay*; família *Myrtaceae*; família *Myrtaceae*/fitoconstituintes; metabólitos primários, metabólitos secundários; compostos fenólicos; plantas medicinais; utilização de plantas medicinais; intoxicação por plantas.

A análise da pesquisa sistemática restringiu-se aos artigos em inglês e português, bem como monografias, dissertações de mestrado e teses de doutorado. Foram selecionados trabalhos originais e revisões sistemáticas de literatura que envolveram o gênero *Campomanesia* e a espécie *C. pubescens*, bem como estudos de toxicidade e efeitos biológicos envolvendo extratos da planta, pesquisas epidemiológicas analíticas e estudos descritivos, exploratórios e explicativos.

A partir do material selecionado, um fichamento foi desenvolvido com intuito de determinar: 1) título, autor, revista e ano de publicação como parâmetros de identificação e; 2) Delineamento da pesquisa, país, período de

condução, população/espécie estudada, metodologia utilizada, resultados, discussão e conclusões das pesquisas, como informações sistemáticas.

Características gerais da família *Myrtaceae*

A família *Myrtaceae* representa uma das maiores da flora brasileira, sendo encontrados mais de 130 gêneros e 4000 espécies de plantas distribuídas entre árvores e arbustos. Nas Américas essa família é conhecida, principalmente, por suas árvores frutíferas (Lorenzi & Souza, 2008). As espécies desta família possuem folhas simples com glândulas oleíferas, flores polistêmones, ovário mediano a ínfero, floema interno e ornamentos através de pontuações que seguem nos vasos do xilema (Gomes *et al.*, 2009).

Muitas plantas desta família estão distribuídas no Cerrado brasileiro. O Cerrado é um dos ecossistemas do Brasil que vem reduzindo devida a exploração irracional feita pelo homem. Muitos esforços vêm sendo empregados para manter e conservar essas áreas, devido a sua importância na biodiversidade vegetal e fauna (Oliveira *et al.*, 2012). Na flora do Cerrado são encontradas espécies frutíferas com potencial importante na utilização agrícola, terapêutica e em pesquisas, visto que são utilizadas pela população local de maneira tradicional e econômica, como é o caso da *C. pubescens* (guavira).

Geralmente, os frutos encontrados nas plantas da família *Myrtaceae* são consumidos *in natura* ou processados e, como parte da cultura Sul Americana, são utilizadas como flavorizantes em destilados alcoólicos. O consumo das plantas desta família aumenta de maneira paulatina devido ao valor nutritivo, econômico e aos efeitos terapêuticos. As indústrias de produtos lácteos e sucos vem explorando cada vez mais a utilização dos frutos para produção de polpas

congeladas, o que aumenta o interesse, tanto de produtores, como de consumidores. Informações acerca das características químicas, valor nutricional e terapêutico, bem como segurança durante o consumo, são ferramentas importantes para formulação de novos produtos, incentivo ao crescimento econômico e avaliação do consumo desses frutos (Kuskoski *et al.*, 2006; Rocha *et al.*, 2011).

Entre as mirtáceas brasileiras há espécies de importância medicinal cujas atividades biológicas incluem: 1) Antioxidante (*Eugenia caryophyllata*, *Eugenia involucrata*, *C. pubescens*, *Campomanesia xanthocarpa*, *Psidium cattleianum*) (Cardoso *et al.*, 2008; Halder *et al.*, 2011; Marin *et al.*, 2008; Rocha *et al.*, 2011); 2) Antimicrobiana (*Eugenia jambolana*, *Syzygium aromaticum*) (Jasmine *et al.*, 2010; Machado, 2010); 3) Hipoglicemiante (*Campomanesia xanthocarpa*, *Eugenia jambolana*) (Biavatti *et al.*, 2004; Kumar *et al.*, 2010); 4) Anti-inflamatória e antinociceptiva (*Eugenia discifera*, *Eugenia candolleana*) (GUIMARÃES *et al.*, 2009; MARIDASS, 2008); 5) Imunomodulatória (*C. pubescens*, *Syzygium aromaticum*) (Carrasco, 2009; Guerrero *et al.*, 2010) e; 6) Hepatoprotetora (*Eugenia jambolana*) (Sisodia & Bhatnagar, 2009).

Muitas espécies dessa família de plantas, infelizmente, vêm desaparecendo da natureza antes mesmo que tenham sido estudadas e desenvolvido conhecimentos básicos sobre a sua biologia, perfil fitoquímico, efeito biológico, eficácia farmacológica ou perfil toxicológico (Gressler *et al.*, 2006).

Distribuição geográfica do gênero *Campomanesia*

Atualmente são conhecidas cerca de 80 espécies do gênero *Campomanesia* das quais 11 são frutíferas (Madalosso *et al.*, 2011). É representado por árvores e arbustos distribuídos da região norte da Argentina até Trinidad e das costas brasileiras até o Peru, Equador e Colômbia. Com relação ao tipo de solo necessário para o seu desenvolvimento, são pouco exigentes, sendo que algumas espécies crescem em solos pobres em nutrientes, como, por exemplo, a *C. adamantium*. Os frutos das *Campomanesias* exibem importância fundamental para o equilíbrio da fauna, visto que é consumida por um grande número de pássaros, pequenos mamíferos, peixes e répteis e são os principais agentes de disseminação das sementes das espécies deste gênero. A floração e maturação dos frutos ocorrem entre os meses de agosto a dezembro. Os frutos são arredondados, apresentam coloração que variam de verde-escuro/claro até amarelo e disseminam aroma adocicado e agradável (Vallilo *et al.*, 2006).

Registro das gabirobeiras em diferentes gêneros e espécies

Grande parte das gabirobeiras estão inseridas na família *Myrtaceae* e pertencem ao gênero *Campomanesia*. Destas, 25 espécies encontram-se do México até a Argentina e 15 são nativas do Brasil onde estão distribuídas, principalmente, da região centro-oeste ao sul (Peixoto *et al.*, 2005). Uma exceção de gabirobeira que não faz parte da família *Myrtaceae* é a *Vitex multinervis* Schauer, conhecida popularmente como gabirobeira-brava pertencente à família *Verbenaceae*. Outras estão inseridas na família *Myrtaceae*, no entanto, não pertencem ao gênero *Campomanesia*, como é o caso da *Abbevillea gabiroba*

Berg (gabioba de cachorro) e a *Abbevillea chrysophylla* Berg (gabioba nativa) (Sousa *et al.*, 2004).

Encontram-se registradas no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento 14 espécies de gabiobeira, descritas na tabela 1.

TABELA 1. Espécies de gabioba registradas no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.

ESPÉCIES DE GABIROBEIRA			
Nome Científico	Nome Comum	Nº De Registro	Data De Registro
<i>Campomanesia adamantium</i> (Cambess.) O.Berg	Gabioba-adamantium	23633	25/06/2088
<i>Campomanesia aromatica</i> (Aubl.) Griseb	Guabiraba	35132	19/01/2016
<i>Campomanesia eugenioides</i> (Cambess.) D.Legrand	Gabioba-do-amazonas	23634	25/06/2008
<i>Campomanesia guaviroba</i> (DC) Kiaersk	Guabioba-laranja, Guabioba	35133	19/01/2016
<i>Campomanesia guazumifolia</i> (Cambess.) O. Berg	Gabioba-capoteira	23635	25/06/2008
<i>Campomanesia hirsuta</i> Gardner	Guabioba-grande	35135	19/01/2016
<i>Campomanesia laurifolia</i> Gardner	Gabioba-laurifolia	23636	25/06/2008
<i>Campomanesia lineatifolia</i> Ruiz & Pav.	Gabioba-da-folha-fina	23637	25/06/2008
<i>Campomanesia neriiflora</i> (O. Berg) Nied.	Gabioba-branca	23638	25/06/2008
<i>Campomanesia phaea</i> (O. Berg) Landrum	Gabioba-cambuci	23639	25/06/2008
<i>Campomanesia pubescens</i> (DC.) O. Berg	Gabioba-pilosa	23640	25/06/2008
<i>Campomanesia reitziana</i> D. Legrand	Gabioba-da-gradá	23641	25/06/2008
<i>Campomanesia schlehtendahlia</i> (O.Ber) Nied.	Gabioba-do-campo	23642	25/06/2008
<i>Campomanesia xanthocarpa</i> O. Berg	Gabioba-de-árvore	23643	25/06/2008

FONTE: (Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, 2018).

Características botânicas da espécie *Campomanesia pubescens* (D.C.) O. BERG

A espécie *C. pubescens* é um arbusto caducifólio que mede de 1 a 2 metros de altura (Figura 2) (Lorenzi *et al.*, 2006). O caule desta espécie é do tipo piloso, folhas oblongas, membranáceas e pilosas nas duas faces, flores isoladas, axilares, brancas, sépalas agudas, triangulares e bractéolas lineares (Sousa *et al.*, 2004).

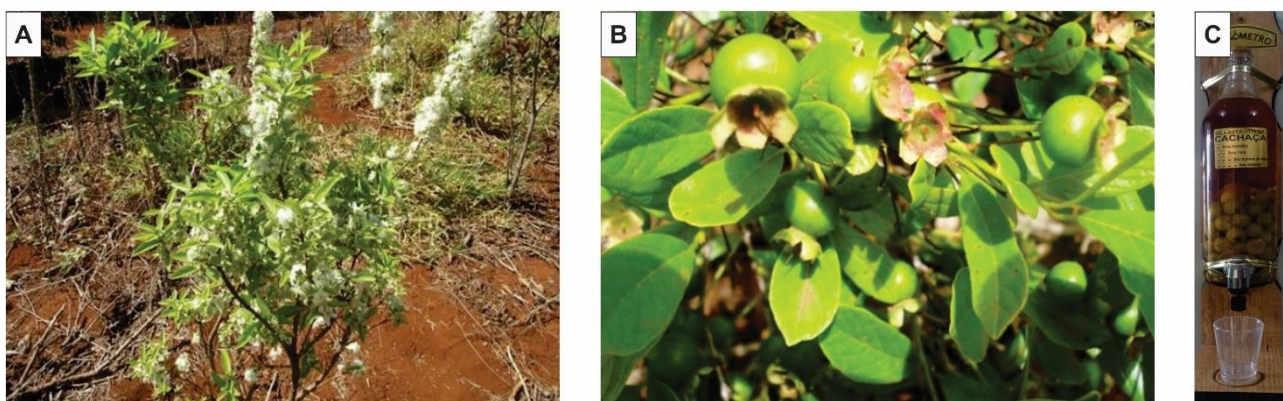


Figura 1. Imagem ilustrativa da *C. pubescens*.

A. Arbusto e flores; **B.** Frutos jovens esverdeados, que tornam-se amarelados quando na fase de maturação; **C.** Frutos sendo utilizados como flavorizante na cachaça. FONTE: PLANTAS DO CERRADO, 2018.

Geralmente, a *C. pubescens* se diferencia das demais guabirobeiras arbustivas por ter pedúnculos densamente pubescentes (termo botânico utilizado para definir parte da planta que é coberta por pelos finos) e, caracteristicamente, mais alongados que o broto floral. Além disso, possuem folhas imaturas por ocasião da antese, ou seja, no momento da abertura dos botões florais, coriáceas quando maduras e pubescentes na face anterior (Lorenzi & Souza, 2008).

Composição química

Os metabólitos de origem vegetal são classificados em primários e secundários. A composição e distribuição de metabólitos vegetais varia de uma planta para outra e a sua ausência não compromete a sobrevivência das células. Os metabólitos secundários podem ser classificados em três grandes grupos, de acordo com a sua rota biossintética: 1) Compostos fenólicos, que são substâncias aromáticas que contêm um ou mais grupamentos hidroxila (-OH); 2) Terpenos e esteroides, formados a partir de unidades isoprenoídicas que possuem cinco átomos de carbono e; 3) Alcaloides, que são bases orgânicas que contêm um átomo de nitrogênio usualmente ligados a estruturas cíclicas de cinco ou seis átomos de carbono. Além desses compostos, existem um grande número de outros metabólitos que não se enquadram nessa classificação geral (Harbone *et al.*, 1999).

Acredita-se que muitas das atividades biológicas das plantas do gênero *Campomanesia* podem ser atribuídas, principalmente, devido a presença de metabólitos secundários produzidos pelas plantas, como, por exemplo, terpenos, flavonoides, champanonas, taninos e saponinas. Muitas dessas substâncias vem sendo investigadas nos laboratórios mundo à fora e já foram identificadas e isoladas (Tabela 2).

TABELA 2. Metabólitos secundários isolados de diferentes espécies de *Campomanesia*.

Espécie	Metabólitos secundários identificados e/ou isolados	Técnica utilizada	Material Vegetal	Referência
<i>C. adamantium</i>	Flavanonas e chalconas (6 compostos)	CLAE-DAD-UV	Extrato fração acetato de etila (frutos)	(Pavan <i>et al.</i> , 2009)

<i>C. adamantium</i>	Monoterpenos (limoneno, α -pineno e β -pineno) e sesquiterpenos (biciclogermacreno e globulol)	CG-EM	Óleo essencial	(Coutinho <i>et al.</i> , 2009)
<i>C. guazumifolia</i> <i>C. pubescens</i> <i>C. xanthocarpa</i>	Quercetrina, miricetina, 3-O-ramnoglicosídeo e rutina.	CLAE	Extrato (folhas)	(Schmeda-Hirschmann, 1995)
<i>C. lineatifolia</i>	Champanonas A, B e C	UV, RMN e IF	Extrato metanólico (sementes)	(Bonilla <i>et al.</i> , 2005)
<i>C. lineatifolia</i>	Componentes voláteis terpenoides, álcoois, ácidos carboxílicos, ésteres, C13-norisoprenoides, Compostos furânicos β -tricetonas e champanonas(150 compostos)	CG e CG-EM	Extrato pentano:dicloro metano (1:1) (frutos, sementes e folhas)	(Osorio <i>et al.</i> , 2006)
<i>C. lineatifolia</i>	Quercitrina, catequina, flavonoides e taninos	CLAE, UV, RMN	Extrato etanólico e fração acetato de etila (folhas)	(Barbosa, 2009)
<i>C. pubescens</i>	Sesquiterpenos e hidrocarbonetos oxigenados (23 compostos) e β -sitosterol	CG-EM	Extrato hexânico (folhas)	(Cardoso <i>et al.</i> , 2008)
<i>C. pubescens</i>	Fração hexânica: 1 2-hidroxi-3'-metil-4',6'-dimetoxichalcona e; 2 7-hidroxi-5-metoxi-6-metilflavanona. Fração acetato de etila: 3 5-hidroxi-7-metoxi-8-metilflavanona; 4 2',4'-dihidroxi-3',5'-dimetil-6'-metoxichalcona e; 5 2',4'-dihidroxi-5'-metil-6'-metoxichalcona.	CCDC e RMN	Extrato etanólico (frutos)	O autor
<i>C. xanthocarpa</i>	Flavonoides, saponinas e taninos	CCD	Extrato hidroetanólico (folhas)	(Markman <i>et al.</i> , 2004)
<i>C. xanthocarpa</i>	Flavonoides, saponinas e taninos	CCD	Extrato seco (folhas)	(Klafke <i>et al.</i> , 2010)

LEGENDA: CCD: cromatografia em camada delgada; CCDC: cromatografia em camada delgada comparativa; CG-EM: cromatografia gasosa acoplada à espectrofotômetro de massas; CLAE: cromatografia líquida de alta eficiência, DAD: detector de arranjo de diodos; IV: espectrofotometria no infravermelho; RMN: ressonância magnética nuclear UV: espectrofotometria no ultravioleta.

Atualmente, já são conhecidas muitas estruturas fenólicas e cerca de metade destas é representada pelos flavonoides, que são biossintetizados a partir de uma unidade fundamental denominada 2-fenilbenzopirona que apresenta 2 anéis fenólicos (A e B) ligados por uma ponte de 3 átomos de carbono (anel C) (Harbone *et al.*, 1999).

As *Campomanesias* de maneira geral apresentam altos teores de flavonoides, e já está bem estabelecido que estes compostos apresentam uma importante ação antioxidante, no entanto, há evidências de que essas substâncias possam desenvolver atividade biológica em vários sistemas como, por exemplo, a permeabilidade capilar, processos secretórios da reposta inflamatória e a atividade sobre enzimas, receptores ou carreadores (Hodek *et al.*, 2002; Mota *et al.*, 2009; Noroozi, 1998).

Dados farmacológicos e toxicológicos

Poucos estudos foram desenvolvidos com o objetivo de investigar potenciais efeitos farmacológicos da *C. pubescens*. No entanto, pesquisas com outras espécies de *Campomanesia* demonstraram efeitos farmacológicos promissores e incentivam a pesquisa com a planta.

Os estudos sobre o gênero *Campomanesia* que foram publicados demonstrando atividades biológicas distintas estão demonstrados na tabela 3.

TABELA 3. Atividade biológica de diferentes espécies de *Campomanesia*.

Espécie	Atividade Biológica e Toxicidade	Material Vegetal	Referência
<i>C. adamantium</i>	Atividade anti- <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Extrato dos frutos – fração acetato de etila	(Pavan <i>et al.</i> , 2009)
<i>C. adamantium</i>	Antioxidante e antimicrobiana contra <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> e <i>Candida albicans</i>	Óleo essencial	(Coutinho <i>et al.</i> , 2009)
<i>C. adamantium</i> <i>C. pubescens</i>	Antimicrobiana contra <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella setubal</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> e <i>Candida albicans</i>	Extrato hexânico (frutos)	(Cardoso <i>et al.</i> , 2010)
<i>C. lineatifolia</i>	Antioxidante	Extrato etanólico e fração acetato de etila (folhas)	(Barbosa, 2009)
<i>C. pubescens</i>	Antioxidante. Toxicidade aguda com microcrustáceo indicando segurança nas doses testadas.	Extrato hexânico (folhas)	(Cardoso <i>et al.</i> , 2008)
<i>C. pubescens</i>	Ansiolítica e antidepressiva. Toxicidade aguda, subcrônica, genotoxicidade e mutagenicidade, indicando segurança nas doses testadas.	Extrato etanólico dos frutos	O autor
<i>C. xanthocarpa</i>	Antiulcerogênica em ratos. Toxicidade aguda em ratos indicando segurança nas doses testadas.	Extrato hidroetanólico (folhas)	(Markman <i>et al.</i> , 2004)
<i>C. xanthocarpa</i>	Redução do colesterol total (TC) e LDL em pacientes hipercolesterolêmicos. Antioxidante e inibitória da enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A redutase <i>in vitro</i> .	Extrato seco (folhas)	(Klafke <i>et al.</i> , 2010)
<i>C. xanthocarpa</i>	Redução do ganho de massa corporal e redução da glicemia em ratos submetidos à dieta hipercalórica.	Extrato aquoso (folhas)	(Biavatti <i>et al.</i> , 2004)

Com o intuito de demonstrar a toxicidade do extrato hexânico das folhas de *C. pubescens* Cardoso e colaboradores (2008) utilizaram um modelo de toxicidade onde ovos de *Artemia salina* foram colocados em um béquer contendo água marinha artificial, ficando sob luz e oxigenação por 24 horas. Após esse período, em média 10 larvas recém eclodidas foram inseridas em frascos na concentração de 550, 1100 e 2200 µg/mL do extrato dissolvidos em água marinha artificial e após 24 horas foram contadas. Os dados obtidos exibiram um perfil não tóxico para o extrato hexânico, visto que não apresentou mortalidade dos microcrustáceos na concentração de 2200 µg/mL.

Outro estudo de toxicidade, porém com ratos, demonstrou que o extrato hidroalcoólico das folhas de *C. xanthocarpa* não apresentou efeito tóxico após a administração da dose de 5000 mg/kg (Markman *et al.*, 2004).

Os estudos desenvolvidos com o intuito de demonstrar a segurança durante o consumo da planta devem atender o que é preconizado pelas agências reguladoras com relação a avaliação da segurança para o consumo humano. Os estudos não clínicos de segurança propostos pelas ANVISA incluem: 1) Estudos de toxicidade de dose única (Aguda); 2) Toxicidade de doses repetidas; 3) Toxicidade reprodutiva; 4) Genotoxicidade, tolerância local e carcinogenicidade. Além destes, também estão propostos pela ANVISA os estudos de interesse na avaliação da segurança farmacológica e toxicocinética (Administração, Distribuição, Metabolismo e Excreção – ADME). Outros estudos que avaliam a segurança da substância teste poderão ser necessários conforme o caso. Os dados de segurança que são obtidos nessa etapa dos estudos dão suporte às Fases 1, 2 e 3 da Pesquisa Clínica (ANVISA, 2013).

Conclusão

Com base nesta revisão sistemática sobre a *Campomanesia pubescens* foi possível verificar que esta espécie apresenta importante valor nutricional, medicinal, cultural e econômico. Apesar de ser muito utilizada pela população, e ainda que pesquisas acerca de efeitos biológicos estejam sendo desenvolvidas, há escassez de estudos que comprovem a atividade biológica apontada pelo uso popular ou delineada a partir dos fitoconstituintes presentes na planta, bem como testes que indiquem segurança para consumo humano. Sendo assim, um nicho científico surge e revela a necessidade de estudos minuciosos, principalmente com relação à utilização da guavira como alimento e aos efeitos farmacológicos e toxicológicos da espécie.

Referências Bibliográficas

ANANTHI, R. *et al.* Genotoxic and antigenotoxic effects of *Hemidesmus indicus* R. Br. root extract in cultured lymphocytes. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 127, n. 2, p. 558–560, 2010.

ANVISA. **Guia para a condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos. Versão 2** Brasília, 2013. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/documents/33836/351410/Guia%2Bde%2BEstudos%2BN%25C3%25A3o%2BCI%25C3%25ADnicos%2B-%2Bvers%25C3%25A3o%2B2.pdf/0afb3f3b-7a32-4232-a7e2-de8ef460c9f7>>

BALLVE, A. C. *et al.* **Plantas medicinais de uso popular (Atlas Farmacognóstico)**. 1th. ed. Canoas: Editora Ulbra, 1995.

BARBOSA, J. **Campomanesia lineatifolia Ruiz e Pav.: Estudo fitoquímico e avaliação da atividade antioxidante [dissertation]**. Belo Horizonte: Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, 2009.

BIAVATTI, M. W. *et al.* Preliminary studies on *Campomanesia xanthocarpa* (Berg.) and *Cuphea carthagenensis* (Jacq.) J.F. Macbr. aqueous extract: Weight control and biochemical parameters. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 93, n. 2–3, p. 385–389, 2004.

BONILLA, A. *et al.* Champanones, Yellow Pigments from the Seeds of *Champa* (*Campomanesia lineatifolia*). **Phytochemistry**, v. 66, n. 1, p. 1736–1740, 2005.

BRASIL. **Práticas integrativas e complementares: plantas medicinais e fitoterapia na Atenção Básica**. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica, 2012.

CARDOSO, C. A. L. *et al.* Avaliação da atividade antioxidante, toxicidade e composição química por CG-EM do extrato hexânico das folhas de *Campomanesia pubescens*. **Revista de Ciências Farmaceuticas Basica e Aplicada**, v. 29, n. 3, p. 297–301, 2008.

CARDOSO, C. A. L. *et al.* Antimicrobial Activity of the Extracts and Fractions of Hexanic Fruits of *Campomanesia* Species (Myrtaceae). **Journal of Medicinal Food**, v. 13, n. 5, p. 1273–1276, 2010.

- CARRASCO, F. R. *et al.* Immunomodulatory activity of *Zingiber officinale* Roscoe, *Salvia officinalis* L. and *Syzygium aromaticum* L. essential oils: evidence for humor-and cell-mediated responses. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 61, n. 7, p. 961–967, 2009.
- CARVALHO, L. M. DE; COSTA, J. A. M. DA; CARNELOSSI, M. A. G. **Qualidade em plantas medicinais**. 1ª ed. Embrapa, 2010. v. 162
- CHAN, K. Some aspects of toxic contaminants in herbal medicines. **Chemosphere**, v. 52, n. 9, p. 1361–1371, 2003.
- COUTINHO, I. D. *et al.* Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS) and evaluation of antioxidant and antimicrobial activities of essential oil of *Campomanesia adamantium* (Cambess.) O. Berg (Guavira). **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 45, n. 4, p. 767–776, 2009.
- FRANÇA, I. S. X. DE *et al.* Medicina popular: benefícios e malefícios das plantas medicinais. **Revista Brasileira de Enfermagem**, v. 61, p. 201–208, 2007.
- GOMES, S. M. *et al.* Anatomia foliar de espécies de Myrtaceae: contribuições à taxonomia e filogenia. **Acta Botanica Brasilica**, v. 23, n. 1, p. 224–238, 2009.
- GRESSLER, E.; PIZO, M. A.; MORELLATO, L. P. C. Polinização e dispersão de sementes em Myrtaceae do Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 29, n. 4, p. 509–530, 2006.
- GUERRERO, F. M. G. *et al.* Investigação da Toxicidade Crônica das Folhas de Guavira (*Campomanesia pubescens*) em Ratos Machos. **Revista Fitos**, v. 5, n. 2, p. 64–72, 2010.
- GUIMARÃES, A. G. *et al.* Antinociceptive and anti-inflammatory effects of the essential oil of *Eugenia candolleana* DC., Myrtaceae, on mice. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 19, n. 4, p. 883–887, 2009.
- HALDER, S. *et al.* Clove Oil Reverses Learning and Memory Deficits in Scopolamine-Treated Mice. **Planta Med**, v. 77, p. 830–834, 2011.
- HARBONE, J. B.; BEXTER, H.; MOSS, G. P. **Phytochemical dictionary: Handbook of bioactive compounds from plants**. 2ª ed. LONDON: Taylor and Francis, 1999.
- HARVEY, A. Strategies for discovering drugs from previously unexplored natural products. **Drug Discovery Today**, v. 5, n. 7, p. 294–300, 2000.
- HODEK, P.; TREFIL, P.; STIBOROVÁ, M. Flavonoids-potent and versatile biologically active compounds interacting with cytochromes P450. **Chemico-**

Biological Interactions, v. 139, n. 1, p. 1–21, 2002.

JASMINE, R. *et al.* Activity of *Eugenia jambolana*, an ethnomedical plant, against drug-resistant bacteria. **Pharmaceutical Biology**, v. 48, n. 4, p. 405–410, 2010.

KLAFKE, J. Z. *et al.* Effects of *Campomanesia xanthocarpa* on biochemical, hematological and oxidative stress parameters in hypercholesterolemic patients. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 127, n. 2, p. 299–305, 2010.

KUMAR, C. H. *et al.* Antidiabetic activity of a polyherbal preparation. **Pharmacologyonline**, v. 2, p. 780–787, 2010.

KUSKOSKI, E. M. *et al.* Frutos tropicais silvestres e polpas de frutas congeladas: atividade antioxidante, polifenóis e antocianinas. **Ciência Rural**, v. 36, n. 4, p. 1283–1287, 2006.

LORENZI, H. *et al.* **Frutas brasileiras e exóticas cultivadas (de consumo in natura)**. São Paulo: Instituto Plantarum, 2006.

LORENZI, H.; SOUZA, W. C. **Botânica Sistemática. Gua ilustrado para identificação das família de fanerógamas nativas e exóticas no Brasil**. 2^a ed. Editora Plantarum, 2008.

MACHADO, M. *et al.* Effects of essential oils on the growth of *Giardia lamblia* trophozoites. **Natural Product Communications**, v. 5, n. 1, p. 137–141, 2010.

MADALOSSO, R. C. *et al.* **Avaliação da toxicidade aguda e da atividade gastroprotetora de extratos de *Campomanesia lineatifolia* Ruiz & Pav. em roedores [dissertation]**. Belo Horizonte: Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, 2011.

MARIDASS, M. Composition and anti-inflammatory activity of the essential oil of *Eugenia discifera* (Myrtaceae). **International Journal of Essential Oil Therapeutics**, v. 2, n. 4, p. 163–166, 2008.

MARIN, R. *et al.* Volatile Components and Antioxidant Activity from some Myrtaceous Fruits cultivated in Volatile Components and Antioxidant Activity from. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 27, n. 2, p. 172–177, 2008.

MARKMAN, B. E. O.; BACCHI, E. M.; KATO, E. T. M. Antiulcerogenic effects of *Campomanesia xanthocarpa*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 94, n. 1, p. 55–57, 2004.

MARQUES, R. C. P. *et al.* Evaluation of the mutagenic potential of yangambin and of the hydroalcoholic extract of *Ocotea duckei* by the Ames test. **Mutation**

Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, v. 536, n. 1–2, p. 117–120, 2003.

MELO-REIS, P. *et al.* Assessment of the mutagenic and antimutagenic activity of *Synadenium umbellatum* Pax latex by micronucleus test in mice. **Brazilian Journal of Biology**, v. 71, n. 1, p. 169–174, 2011.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Cultivar Web**. Disponível em: <http://sistemas.agricultura.gov.br/snpc/cultivarweb/cultivares_registradas.php>. Acesso em: 15 jan. 2018.

MOTA, K. S. DE L. *et al.* Flavonoids with gastroprotective activity. **Molecules**, v. 14, n. 3, p. 979–1012, 2009.

MUHAMMAD, H. *et al.* Evaluation of the genotoxicity of *Orthosiphon stamineus* aqueous extract. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 133, n. 2, p. 647–653, 2011.

MUNARI, C. C. *et al.* Evaluation of the genotoxic and antigenotoxic potential of *Baccharis dracunculifolia* extract on V79 cells by the comet assay. **Journal of Applied Toxicology**, v. 30, n. 1, p. 22–28, 2010.

NOROOZI, M. *et al.* Effects of flavonoids and vitamin C on oxidative DNA damage to human lymphocytes. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 67, n. 6, p. 1210–1218, 1998.

OLIVEIRA, J. DA S. *et al.* Potencial alelopático de espécies arbóreas nativas do cerrado. **REVISTA DE BIOLOGIA E CIÊNCIAS DA TERRA**, v. 12, p. 7–11, 2012.

OSORIO, C. *et al.* Characterization of odor-active volatiles in champa (*Campomanesia lineatifolia* R. & P.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 2, p. 509–516, 2006.

PAVAN, F. R. *et al.* Evaluation of anti-mycobacterium tuberculosis activity of *campomanesia adamantium* (myrtaceae). **Química Nova**, v. 32, n. 5, p. 1222–1226, 2009.

PEIXOTO, N. *et al.* Avaliação do crescimento inicial de populações de gabioba em Ipameri. **Congresso de Ensino, Pesquisa e Extensão da UEPG**, p. 6, 2005.

RAYNOR, D. K. *et al.* Buyer beware? Does the information provided with herbal products available over the counter enable safe use? **BMC Medicine**, v. 9, n. 1, p. 94, 2011.

- REGNER, G. G. *et al.* Toxicological evaluation of *Pterocaulon polystachyum* extract: A medicinal plant with antifungal activity. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 31, n. 1, p. 242–249, 2011.
- ROCHA, E. O.; MORAIS, S. A. L.; CHANG, R. **Avaliação dos constituintes fenólicos e voláteis, atividade antioxidante e antimicrobiana de *Campomanesia pubescens* (DC.) O. Berg (Gabirola) [dissertation]**. Uberlândia-MG: Programa de Pós-graduação do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia, 2011.
- SCHMEDA-HIRSCHMANN, G. Flavonoids from *Calycorectes*, *Campomanesia*, *Eugenia* and *Hexachlamys* species. **Fitoterapia**, v. 66, p. 373–441, 1995.
- SHIN, I. S. *et al.* Genotoxicity assessment of Pyungwi-san (PWS), a traditional herbal prescription. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 133, n. 2, p. 696–703, 2011.
- SILVEIRA, P. F. DA; BANDEIRA, M. A. M.; ARRAIS, P. S. D. Farmacovigilância e reações adversas às plantas medicinais e fitoterápicos: Uma realidade. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 18, n. 4, p. 618–626, 2008.
- SISODIA, S. S.; BHATNAGAR, M. Hepatoprotective activity of *eugenia jambolana* lam. In carbon tetrachloride treated rats. **Indian Journal of Natural Products and Resources**, v. 8, n. 3, p. 291, 2009.
- SOUSA, J. S. I. *et al.* **Enciclopédia agrícola brasileira: E-H**. Edição Ilu ed. EdUSP, 2004.
- TUROLLA, M. S. DOS R.; NASCIMENTO, E. DE S. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 42, n. 2, p. 289–306, 2006.
- VALLILO, M. I. *et al.* Composição química dos frutos de *Campomanesia adamantium* (Cambessédes) O.Berg. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 4, p. 805–810, 2006.
- VALLILO, M. I. *et al.* Composição química dos frutos de *Campomanesia xanthocarpa* Berg-Myrtaceae. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, p. 231–237, 2008.

6.2. Artigo II: Preclinical safety evaluation of the ethanolic extract from guavira fruits (*Campomanesia pubescens* (D.C.) O. BERG) in experimental models of acute and short-term toxicity in rats

Aceito no periódico “*Food and Chemical Toxicology*” (Fator de Impacto 3,778, Qualis A2 na área Medicina II). Data do aceite: 28/04/2018.

DOI: 10.1016/j.fct.2018.04.063

Link

da

publicação:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0278691518302862>

6.3. Artigo III: Preclinical safety evaluation of the ethanolic extract from *Campomanesia pubescens* (D.C.) O. BERG (guavira) fruits: Analysis of genotoxicity and clastogenic effects

Submetido ao periódico “*Chemosphere*” (Fator de Impacto 4,208, Qualis A2 na área Medicina II). Submetido em: 03/05/2018.

Link com as normas da revista: <https://www.elsevier.com/journals/chemosphere/0045-6535/guide-for-authors>

Preclinical safety evaluation of the ethanolic extract from *Campomanesia pubescens* (D.C.) O. BERG (guavira) fruits: Analysis of genotoxicity and clastogenic effects

Gustavo Roberto Villas Boas^{a*}, Flávio Henrique Souza de Araújo^b, Jhony Moreira Marcelino^b, Luis Henrique Almeida Castro^b, Ana Paula Stefanello da Silveira^c, Renato Silva Nacer^c, Fabio Rodrigues de Souza^c, Claudia Andréa Lima Cardoso^d, Roseli Boerngen de Lacerda^e, Zaira da Rosa Guterres^f and Silvia Aparecida Oesterreich^b.

^a *Center of Biological Sciences and Health, Federal University of the West of Bahia, Barreiras, Bahia, Brazil.*

^b *Faculty of Health Sciences, Federal University of Grande Dourados, Dourados, Mato Grosso do Sul, Brazil.*

^c *Faculty of Health Sciences, University Center of Grande Dourados, Dourados, Mato Grosso do Sul, Brazil.*

^d *Chemistry Course, State University of Mato Grosso do Sul, Dourados, Mato Grosso do Sul, Brazil.*

^e *Department of pharmacology of the Biological Sciences Center, Federal University of Paraná, Curitiba, Paraná, Brazil.*

^f *Cytogenetic and Mutagenesis Laboratory, State University of Mato Grosso do Sul, Dourados, Mato Grosso do Sul, Brazil.*

^a Center of Biological Sciences and Health, Federal University of the West Bahia, Rua Bertoga, 892, Morada Nobre II, CEP 47810-059, Barreiras-BA, Phone: +55 (77) 3614-3152 (gustavo.villasboas@gmail.com).

^b Faculty of Health Sciences, Federal University of Grande Dourados, Dourados Rodovia Dourados, Itahum Km 12, Cidade Universitária, Caixa. postal 364, CEP 79804-970, Dourados-MS, Fone +55 (67) 3410-2001 (flaviobiosmart@gmail.com);

jhony.moreira@hotmail.com.br; nutricao.luishenrique@gmail.com
silviaoesterreich@gmail.com).

^c Faculty of Health Sciences, University Center of Grande Dourados, Rua Balbina de Matos, 2121, Jd. Universitário, CEP 79.824-900, Dourados-MS, Phone: +55 (67) 3411-4141 (anapaulastefanello@hotmail.com; fisioterapia.capital@unigran.br; fabibata@hotmail.com).

^d Chemistry Course, State University of Mato Grosso do Sul, Rodovia Dourados, Itahum Km 12, Cidade Universitária, Caixa postal 351, CEP: 79804-970, Dourados-MS, Fone +55 (67) 3902-2360 (claudia@uems.br).

^e Department of pharmacology of the Biological Sciences Center, Federal University of Paraná, Jardim das Américas, Caixa. postal 19031, CEP 81531-990, Curitiba-PR, Phone: +55 (41) 3361-1720 (boerngen@hotmail.com).

^f Cytogenetic and Mutagenesis Laboratory, State University of Mato Grosso do Sul, BR 163, Km 20;2, CEP: 79980-000, Mundo Novo-MS, Fone +55 (67) 3923-3181 (zairaguterres@yahoo.com.br).

Abstract

Genotoxicity studies of plants with medicinal and nutritional properties are recommended by international regulatory agencies as part of the risk assessment. Due to their consumption as food and drug and ethnopharmacological relevance, *Campomanesia pubescens* (D.C.) O. BERG represents one of these plants to be studied. The aim of the present study was to evaluate the genotoxic, cytotoxic potential and clathogenic effects of the ethanolic extract obtained from the pulp of *C. pubescens* (EEFCP) fruits on rats submitted to experimental genotoxicity models and through the SMART test performed in *Drosophila melanogaster*. The comet assay and the micronucleus test were performed on peripheral and bone marrow blood, respectively, of Wistar rats orally treated with EEFCP at doses of 125, 250, 500 and 1000 mg/kg/bw for 28 consecutive days. In the SMART test, the standard cross between three mutant *D. melanogaster* strains was used. Larvae were treated with EEFCP at different concentrations and the wings of adult flies were evaluated for the presence/frequency of mutant spots and compared to the negative control group. Phytochemical analysis of EEFCP indicated high levels of flavonoids. The tests performed in rats showed that EEFCP did not present significant genotoxic or clastogenic effects on cells treated with the four doses tested. The biotransformation metabolites of EEFCP did not present genotoxic activity, as demonstrated by the SMART test in the offspring of the high bioactivation cross. Together, all results indicate that, under the experimental conditions used, EEFCP did not reveal any preclinical genetic toxicity.

Keywords: Genotoxicity; Mutagenesis; Comet assay; Micronucleus; SMART test; Preclinical safety.

1. Introduction

In the last decade, the use of medicinal plants, phytonutrients or nutraceuticals has increased substantially worldwide, with many people using these resources to treat various pathologies in different international health settings (Harvey, 2000; WHO, 2004). According to the World Health Organization (WHO) about 70-80% of the world population depends exclusively on medicinal plants for primary health care (Chan, 2003; Muhammad *et al.*, 2011). In addition, despite the large methodological collection for obtaining synthetic drugs, medicinal plants represent important sources of new molecular identities, mainly because they synthesize constituents that are difficult to obtain by chemical synthesis. These compounds obtained from natural sources may serve as prototypes for the synthesis of new drugs with similar biological and therapeutic activities or be modified to make them more effective or less toxic (Harvey, 2000; Munari *et al.*, 2010; Regner *et al.*, 2011; Robbers *et al.*, 1996; Turolla and Nascimento, 2006).

About 80 species of the genus *Campomanesia* are known, of which 11 are fruit species (Madalosso *et al.*, 2011) distributed from northern Argentina to Trinidad and from Brazilian coasts to Peru, Ecuador and Colombia. The flowering and ripening of fruits occur from August to December. Fruits are rounded, have coloration ranging from dark/light green to yellow and have sweet and pleasant aroma (Prado and Silva, 2013; Vallilo *et al.*, 2006). *Campomanesia pubescens* (D.C.) O. BERG, popularly known as guavira, is a deciduous shrub that measures 1 to 2 meters in height (Lorenzi *et al.*, 2006). *C. pubescens* fruits are widely used fresh and in the form of sweets, ice cream, soft drinks, liqueurs and, often, as flavorings in alcoholic distillates (Vallilo *et al.*, 2008).

Studies have shown that *C. pubescens* leaves present anti-inflammatory effect due to the reduction of circulating monocytes (Guerrero *et al.*, 2010) and antioxidant

effect using the β -carotene/linoleic acid method (Cardoso *et al.*, 2008) and 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) (Rocha *et al.*, 2011). In addition, it is also used by the local community for other therapeutic purposes, among them, depurative action, antidiarrheal and reduction of blood cholesterol levels (Ballve *et al.*, 1995).

Previous studies have demonstrated that the extract obtained from *C. pubescens* leaves have monoterpenes (limonene), sesquiterpenes and triterpenes (Cardoso *et al.*, 2008) and myricitrin (Schmeda-Hirschmann, 1995). In addition, chemical studies with other *Campomanesia* species demonstrated the presence of the following secondary metabolites: 1) flavanones, chalcones (Pavan *et al.*, 2009), monoterpenes (limonene, α -pinene and β -pinene) and sesquiterpenes (bicyclogermacrene and globulol) (Coutinho *et al.*, 2009), obtained from *C. adamantium*; 2) Champanones A, B and C (Bonilla *et al.*, 2005), volatile constituents terpenoids, alcohols, carboxylic acids, esters, C13-norisoprenoids, furanic compounds β -triketones, champagnons (Osorio *et al.*, 2006), quercitrin, catechin and tannins (Barbosa, 2009) obtained from *C. lineatifolia* and; 3) flavonoids, saponins and tannins obtained from *C. xanthocarpa* (Klafke *et al.*, 2010; Markman *et al.*, 2004).

The consumption of *C. pubescens* fruits has increased rapidly due to its nutritional, economic value and therapeutic effects. In addition, the dairy and juice industries are increasingly exploring the use of these fruits for the production of frozen pulps, which increases the interest of both producers and consumers. Information on chemical characteristics, nutritional and therapeutic value, as well as safety during consumption are important tools for formulating new products, encouraging economic growth and evaluating the consumption of these fruits (Kuskoski *et al.*, 2006; Rocha *et al.*, 2011). As a consequence of the overall increase in the use of these plants, it has become essential to provide the general public, including health professionals, with

adequate information to facilitate a better understanding of the risks associated with the use of these products and to ensure that all therapies are properly safe (Ekor, 2014).

Toxicological genetics is an important branch of toxicology and, as such, genotoxicity must be properly assessed throughout the safety assessment process of a given substance. Several *in vitro* and *in vivo* assays have provided tools for the analysis and identification of agents that expose users to genotoxic risks (Annangi *et al.*, 2016; Nersesyan *et al.*, 2016). Genotoxicity assays are used to identify extracts/substances that have the ability to interact with nucleic acids at low concentrations producing chromosomal aberrations and/or changes in DNA structure and even irreversible cell changes (Varanda *et al.*, 2002). The consequences of these DNA changes could be the establishment and / or predisposition to diseases, increased morbidity/mortality, changes in hereditary characteristics and impaired reproductive capacity (Lázaro *et al.*, 2010).

The somatic recombination and mutation test of the *Drosophila melanogaster* wing provides a rapid means to assess the potential of a chemical substance to induce loss of heterozygosity (LOH) resulting from genetic mutation, chromosome rearrangement, chromosome breakage or chromosomal loss (Andrade *et al.*, 2004; Lombardot *et al.*, 2015; Sarikaya *et al.*, 2012). Currently, it is the main test developed to test genotoxicity associated with chemical substances after biotransformation (Lombardot *et al.*, 2015).

Two other tests used to assess genotoxicity are the comet assay and the micronucleus test. The comet assay detects breaks in DNA strands in cells of animals exposed to a test substance (OECD, 2016a), while the micronucleus test is used to detect chromosome damage in the bone marrow of rodents (OECD, 2016b).

The above tests are routinely used to assess the toxicological spectrum of chemicals, plant extracts and drugs and are required by international regulatory agencies for the production of new drugs.

Due to the expressive consumption of *C. pubescens* fruits, mainly in the form of liqueurs and flavorings in alcoholic beverages as part of the South American culture (where ethanol acts as extractor of aromatic substances that give characteristic flavor to beverages), and considering its nutritional and pharmacological importance and lack of controlled scientific studies that evaluate its genotoxicity in order to promote safe consumption and, consequently, profits from plant commercialization, the aim of this research was to evaluate the genotoxic, cytotoxic and clathrogenic effects of the ethanolic extract obtained from the pulp of *C. pubescens* fruits on rats submitted to experimental genotoxicity models and through the SMART test performed in *Drosophila melanogaster*.

2. Material and Methods

2.1. Botanical material and extract preparation

C. pubescens fruits were collected in December 2015 in Dourados, Mato Grosso do Sul, Brazil (20° 26 '34 "S and 54° 38' 47" W), according to authorization issued by the Brazilian Environment Agency (registration number 61621-2 - MMA/ICMBio/SISBIO) and an exsicata (registry No. 839) was deposited at the Herbarium of the Federal University of Grande Dourados (UFGD), Mato Grosso do Sul, Dourados, MS, Brazil. Previously crushed fresh fruits (1500.10 g) were macerated with 2 liters of ethanol for 7 days. After filtration, the resulting slurry was again extracted with 2 liters of ethanol, the union of the liquid fraction obtained after rotavaporation resulted in 334.67 g of ethanolic extract from *C. pubescens* fruits (EEFCP).

2.2. Quantification of the flavonoid content

For quantification of the flavonoid content, the protocol described by (Lin and Tang, 2007) was used. EEFCP was solubilized in ethanol at concentration of 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$. In the test, 1.5 mL of 95% ethyl alcohol, 2.8 mL of distilled water, 500 μL of sample, 100 μL of sodium acetate ($\text{NaC}_2\text{H}_3\text{O}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) 1 mol.L^{-1} and 100 μL of 10% aluminum chloride ($\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) were used. After 40 minutes of reaction at room temperature, readings were performed in spectrophotometer at 415 nm.

For the blank, the same procedure was performed, with sample being replaced by ethanol. To calculate the flavonoid concentration, an analytical curve (2.5, 5.0, 10.0, 20.0, 25.0, 50.0, 100.0 and 125.0 μg) was prepared using quercetin as standard. The experimental procedure performed with the standard was the same used for samples. Data were submitted to linear regression, obtaining the equation of the line, which had its data used in the calculation of real samples. The results were expressed in milligrams of quercetin per gram of extract and tests were performed in triplicate.

2.3. Extract fractionation

The EEFCP extract (50.15 g) was dissolved in water: ethanol (3: 1 v/v) and partitioned with organic solvents (hexane and ethyl acetate). The hexane fraction of EEFCP was fractionated on a chromatographic column using silica gel (0.063-0.200 mm, Merck) in gradient solvent system (hexane and ethyl acetate) and the obtained fractions were analyzed by comparative thin-layer chromatography (TLC, Macherey-Nagel) and 95: 5 v/v hexane: ethyl acetate on elution. Fractions 57-75 were pooled and submitted to purification using preparative thin-layer chromatography (TLC) with 20x20 cm plates on silica gel and elution was performed using 85:15 v/v ethyl hexane: acetate, yielding two samples (**F-1**, 1.7 mg and **F-2**, 1.9 mg). The ethyl acetate fraction of EEFCP was fractionated on a chromatographic column using silica gel (0.063-0.200 mm, Merck) in gradient solvent system hexane: ethyl acetate (7: 3 v/v) (1), hexane:

ethyl acetate (5: 5 v/v) (2), ethyl acetate (3) and ethanol (4), resulting in a fraction for each solvent system. Fractions were analyzed by TLC, denominated 1, 2 and 3 and submitted to TLC fractionation. Fractions 1 and 2 were eluted using 7: 3 v/v ethyl hexane: ethyl acetate and fraction 3 was eluted with 4: 6 v/v ethyl hexane: ethyl acetate. From fraction 1, a solid of 2.3 mg (**F-3**) was obtained; fraction 2, 2.0 mg (**F-4**) and fraction 3 2.0 mg (**F-5**) were obtained. Substances were identified using spectroscopic analyses (RMN ¹H, ¹³C and RMN 2D) and data obtained were compared to those described in literature (Agrawal, 1989; Byrne *et al.*, 1982; Mustafa *et al.*, 2005; Solladié *et al.*, 1999; Srivastava *et al.*, 1995).

2.4. Animals and treatments

Sixty Wistar rats (*Rattus norvegicus*) of both sexes (30 females and 30 males), age between 45 and 60 days and weight of 111 g ± 8.85% were used in this study. Animals were obtained from the State University of Maringá and housed in cages suitable for rodents with dimensions of 41 x 34 x 16 cm (5 animals/cage), under standard conditions of temperature (22 ± 2° C) and humidity (40-60%) and with *ad libitum* access to water and feed. All experimental procedures were developed according to ethical precepts of animal research and previously approved by the Commission of Ethics in Animal Use of the UFGD (protocol No. 33/2017).

Six groups containing 5 males and 5 females were established, namely: 1) negative control group, treated for 28 days with oral saline; 2) test groups, treated for 28 days with oral EEFCP (gavage) (groups: A) 125 mg/kg; B) 250 mg/kg; C) 500 mg/kg and; D) 1000 mg/kg); 3) positive control group, treated with 50 mg/kg/bw of cyclophosphamide monohydrate, i.p. 24 hours before eutanásia.

2.5. Comet assay

The experimental design of the comet assay was established taking into account the guidelines of the Organization for Economic Cooperation and Development (OECD)

(OECD, 2016a) for chronic exposure. The analyses were performed on whole blood of the animals after 28 consecutive days of treatment.

Blood samples were collected from caudal puncture, and 40 μ L were transferred to wells containing 120 μ L of lowmelting point agarose (1.5%) at 37° C. The mixture was homogenized and transferred to plates precoated with normal agarose (5%). After solidification of the agarose (3° C 20 min), the slides were transferred to final lysis solution for 2 h at 3° C.

After lysis, the slides were placed in electrophoresis tank filled with alkaline buffer and were left at rest for 20 min to denature the DNA. After the denaturation step, the electrophoretic run was started (20 min at 4C with 300 mA and 25 V). Subsequently, the slides were removed from the chamber and covered by neutralization solution in three cycles of 5 min each. The slides were fixed in absolute ethanol for 10 min and then transferred to the refrigerator until the time of analysis. Slides were stained with ethidium bromide solution (0.002 mg/mL) and analyzed with a fluorescence microscope equipped with excitation filter (420-490 nm) and barrier filter (520 nm). Each slide was identified and examined in a blind test, in which 100 cells were analyzed per animal. The comet findings were classified as follows: class 0 (no damage); class 1 (comet tail shorter than the diameter of the nucleoid); class 2 (comet tail once or twice the diameter of the nucleoid); and class 3 (comet tail greater than twice the size of the nucleoid) (figure 1a, 1b, 1c e 1d, respectivamente). From the readings, two parameters were calculated for each animal: damage index and damage frequency. The damage index refers to the extent and severity of the damage observed in the cells. Damage frequency shows the amount of cells, out of the 100 analyzed cells, which have some kind of damage.

INSERT FIGURE 1a, 1b, 1c e 1d HERE.

2.6. Micronucleus assay

The experimental design of the micronucleus test was established in accordance with the OECD guidelines (OECD, 2016b). The analyses were performed with polychromatic erythrocytes (PCEs) from the bone marrow of animals after 28 consecutive days of treatment to obtain chronic data.

Immediately after euthanasia, each animal had its right femur removed and separated from adjacent muscles. The two ends of the femur were cut to expose the bone marrow. The marrow canal was washed with 1 mL of fetal bovine serum so as to push the marrow into a centrifuge microtube. The suspension was centrifuged for 5 min at 1000 g. The supernatant was discarded, and the pellets were used to make smears on slides. The slides were fixed with methanol for 10 min and stained with Giemsa for 15 min.

Each slide was identified and analyzed under blind conditions, and 2000 PCEs were analyzed per animal. Each erythrocyte was identified by the presence or absence of micronuclei (figure 2). To evaluate the possible cytotoxic effects, the ratio of polychromatic and normochromatic erythrocytes (PCEs/NCEs) was calculated by analyzing 200 random erythrocytes per animal.

INSERT FIGURE 2 HERE.

2.7. SMART Test

2.7.1. Crossings

The SMART test was performed through experimental crosses among three mutant *D. melanogaster* strains with the following genetic markers: 1) Multiple wing hairs (*mwh*), which has phenotypic manifestation characterized by three or more hairs

per wing cell; 2) ORR/flr^3 ($ORR/flare^3$) presented by the simple e; 3) flr^3 ($flare^3$) with phenotypic characterization manifested by a flame-modified hair.

From the above-mentioned strains, two crosses were performed: 1) standard cross (ST-standard cross) between *mwh* males and virgin flr^3 females (Graf *et al.*, 1984); and 2) high bioactivation cross (HB) between *mwh* males and virgin ORR/flr^3 females (Graf and van Schaik, 1992). Both crosses produced transmarker heterozygous individuals (MH) with mwh/flr^3 genotypic constitution, and balanced heterozygous individuals (BH), consisting of $mwh/TM3, Bds$, which can be easily recognized by the phenotypic aspects of trimmed borders (serrate). MH individuals are able to detect point mutations, small chromosomal aberrations and proximal and distal mitotic recombination, and the analysis of BH individuals allows detecting the occurrence of point mutations and small chromosomal aberrations (Guzmán-Rincon and Graf, 1995).

2.7.2. Treatments

Four hundred virgin flr^3 and ORR females were selected, which were crossed with 200 *mwh* males for a period of 48 hours. Subsequently, couples were transferred for a period of 8 hours to flasks containing a solid agar-agar base covered by a layer of biological yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) supplemented with sugar for egg collection. After 72 ± 4 hours, the larvae of the third development stage were washed with running water and collected with the aid of a fine mesh sieve. Groups of approximately 100 larvae were transferred into glass tubes containing 1.5 g of alternative culture medium (Yoki® instant potato puree) and 5.0 mL of EEFCP at concentrations of 2.5, 5.0 and 10 mg/mL). Vehicle (distilled water, 3% ethanol and 1% tween-80) was used as negative control and 0.125 mg/mL doxorubicin hydrochloride (DXR) was used as positive control. Emerging adults with both types of genotypes ($mwh +/+ flr^3$ (transmarker heterozygous MH) and $mwh +/+ TM3, BdS$ (balanced heterozygote - BH) were collected and fixed in 70% ethanol. Wings were detached and mounted between slides

and coverslips with Faure's solution (30 g arabic gum, 50 g chloral hydrate, 100 ml water and 20 ml glycerol) and analyzed for the occurrence of different types of mutant spots under optical microscopes with magnification of 400X.

2.8. Statistical analyses

All results were expressed as means \pm standard error of the mean (SEM). To analyze the results of the comet and micronucleus assays, one-way ANOVA was used, followed by Duncan's *post hoc* test. The significance level was defined as $p < 0.05$. Statistical analyses were performed using Statsoft Statistica software version 7.0 for Windows.

For the SMART test analysis, the Conditional Binomial test (Kastembaum and Bowman, 1970) was used, with significance level $\alpha = \beta = 0.05$. The frequencies of each type of mutant spot per fly were compared with the respective negative controls, allowing the characterization of results as positive, weak-positive, negative or inconclusive (Frei and Würzler, 1988). In the practical application of the decision method, in addition to the null hypothesis, a specific alternative hypothesis is elaborated, which requires a mutation frequency m times greater in the treated group than that obtained in the negative control.

3. Results

3.1. Analysis of EEFCP

The content of flavonoids was 56.84 mg of quercetin per gram of extract. Five flavonoids were isolated from EEFCP, 2 isolated from the hexanic fraction (**F-1** 2-hydroxy-3'-methyl-4', 6'-dimethoxychalcona and **F-2** 7-hydroxy-5-methoxy-6-methylflavanone) and 3 isolated from the ethyl fraction (**F-3** 5-hydroxy-7-methoxy-8-methylflavanone; **F-4** 2',4'- dihydroxy -3',5'-dymethyl -6'methoxychalcona and **F-5** 2',4'-dihydroxy-5'-methyl-6'-methoxychalcona).

3.2. Comet assay

Statistical analysis showed significant increase in the DNA damage index of females from the positive control group when compared to negative control groups and all tested EEFCP doses (125, 250, 500 and 1000 mg/kg/bw) ($F(5,24)=475.12$, $p<0.001$, for both groups). The same effect was observed in males ($F(5,24)=965.81$, $p<0.001$, for both groups) (table 1). Regarding the damage frequency, the analysis revealed statistically significant increase of injured cells in the positive control group when compared to negative control groups and all tested EEFCP doses (125, 250, 500 and 1000 mg/kg/bw), both for females ($F(5,24)=272.92$, $p<0.001$, for both groups), and males ($F(5,24)=566.69$, $p<0.001$, for both groups) (figure 3a and 3b). For both the index and the damage frequency all tested EEFCP doses were statistically similar to those of the negative control group, demonstrating that there was no genotoxic effect from EEFCP administration.

INSERT FIGURE 3a e 3b HERE

INSERT TABLE 1 HERE.

3.2. Micronucleus test

Figure 4a shows the differences between means of micronucleated polychromatic erythrocytes (MN-PCEs) in all experimental groups, in both females and males, respectively. Statistical analysis revealed that both females and males from the positive control group had significant increase in the number of MN-PCEs when compared to the negative control group and all the EEFCP-treated groups (125, 250, 500 and 1000 mg/kg/bw) ($F_{\text{FEMALES}}(5,24)=70.86$, $p<0.001$, for both groups; $F_{\text{MALES}}(5,24)=45.85$, $p<0.001$, for both groups), as expected. There was no statistical difference between groups treated with EEFCP and the negative control group. Regarding the PCE/NCE ratio, statistical analysis showed that treatment with EEFCP did not cause any significant changes in females, except for the EEFCP 1000 mg/kg

group, which showed significant increase when compared to negative control ($F(5,24)=175.25$, $p<0.001$) (Figure 5a). For males, the analysis showed that the EEFCP 500 mg/kg and EEFCP 1000 mg/kg groups had significant increase in PCE/NCE ratio when compared to negative control ($F(5,24)=276.30$, $p<0.01$, for both groups), demonstrating that EEFCP has an important dose-dependent effect of reducing cytotoxicity. However, the EEFCP 125 mg/kg group showed significant reduction in the PCE/NCE ratio when compared to negative control ($F(5,24)=276.30$, $p= 0.01$) (Figure 5b)

INSERT FIGURE 4a and 4b HERE.

INSERT FIGURES 5a and 5b HERE.

3.2. SMART Test

Table 2 shows the results obtained from the analyses of *mwh/flr³* offspring obtained from the ST crossing treated with EEFCP. The groups treated with the three concentrations of EEFCP showed a survival rate greater than 80%, demonstrating nontoxic activity of the extract. The negative control presented frequency of 0.30 in relation to the total number of mutant spots per individual, whereas in the positive control, the total frequency of spots was 11.05. Statistical analysis showed that EEFCP at the concentrations tested, had frequency of clone formation per individual of 0.45 to 0.60, not statistically different from that observed in the negative control. In addition, the results showed that in the *mwh/flr³* offspring from the HB crossing, which had elevated levels of P450 cytochrome with high xenobiotic metabolism capacity, the frequency of mutant spots was 0.55 for the negative control group and 7.45 the positive control group. In EEFCP-treated groups, the frequency of mutant spots ranged from 0.25 to 0.40, not statistically differing from the negative control.

INSERT TABLE 2 HERE.

4. Discussion

Although medicinal plants may have important pharmacological effects, in many cases they have also toxic effects, which are particularly important and serious, since the vast majority of the population makes indiscriminate use of these plants (Guerrero *et al.*, 2010). Information on chemical characteristics, nutritional and therapeutic value as well as safety during consumption are important tools for formulating new products, encouraging economic growth, assessing consumption (Kuskoski *et al.*, 2006; Rocha *et al.*, 2011), and establishing criteria for selecting safe doses of products obtained from these fruits (Farsi *et al.*, 2013).

In the present study, the chemical analysis of EEFCP demonstrated flavonoid content of 56.84 mg of quercetin per gram of extract. Five flavonoids were isolated from the extract, two of which were obtained from the hexane fraction (**F-1** 2-hydroxy-3'-methyl-4', 6'-dimethoxychalcon and **F-2** 7-hydroxy-5-methoxy-6-methylflavanone) and 3 from the ethyl acetate fraction (**F-3** 5-hydroxy-7-methoxy-8-methylflavanone; **F-4** 2', 4'-dihydroxy-3', 5'-dimethyl-6'-methoxychalcone and **F-5** 2', 4'-dihydroxy-5'-methyl-6'-methoxychalcone). Previous studies using extracts from *C. pubescens* leaves have revealed high contents of specific flavonoids, such as quercetin and myricetin (Schmeda-Hirschmann, 1995), corroborating the fact that this *Campomanesia* species contains high levels of this secondary metabolite. However, studies involving the ethanolic extract from *C. pubescens* fruits are scarce, and our group is one of the pioneers to demonstrate their phytochemicals as well as their toxic potential.

Currently, the interest for flavonoids has been related to the beneficial potential health benefits coming from its antioxidant activity. The functional hydroxyl groups of flavonoids mediate their antioxidant effects through the removal of free radicals and/or

chelation of metallic ions (Kumar *et al.*, 2013b; Kumar and Pandey, 2013). Metal chelation may be crucial in preventing the generation of radicals that damage specific biomolecules, such as DNA (Kumar *et al.*, 2013a; Leopoldini *et al.*, 2006). As a dietary component, flavonoids are believed to have health-promoting properties because of their high antioxidant capacity, both *in vivo* and *in vitro* (Cook and Samman, 1996; Rice-evans *et al.*, 1995).

The antioxidant potential of medicinal plants plays an important role in genetic toxicology, since reactive oxygen species (ROS) can damage DNA. Such damage, caused by oxidation, is considered the most relevant type of damage to cellular metabolism (El-khamisy and Caldecott, 2006). Evidence suggests that cumulative DNA damage caused by EROs contributes to several adverse clinical conditions, such as cancer (Palyvoda *et al.*, 2003). For this reason, the safe consumption of foods containing antioxidant compounds may be directly associated with preventing the development of diseases such as cancer. In the present study, high content of flavonoids was detected, and 5 different flavonoids were isolated. Previous studies have demonstrated the antioxidant activity of *C. pubescens* extracts rich in flavonoids (Cardoso *et al.*, 2008; Rocha *et al.*, 2011).

Several biological assays can be used for monitoring and initial screening of the genotoxic potential of plant extracts. *In vitro* and *in vivo* genotoxicity studies are used to detect the potential of a substance to induce gene mutations and chromosomal abnormalities (ANVISA, 2013), since these events are prerequisites for the development of fatal diseases, such as cancer. Genotoxicity is not a measure of carcinogenicity, but is often used as an indicator for cancer, since this test measures an initial or intermediate event in tumorigenesis (Traesel *et al.*, 2017). The comet assay is a sensitive and reliable method for detecting lesions on DNA strands. This assay is

considered a genotoxic test, since such lesions can still be repaired (OECD, 2016a). In the present study, for both the damage index (table 1) and the damage frequency (figure 3a and 3b), the negative control group presented lower lesion values when compared to the positive control group, as expected. This confirms the reduced genetic damage rate in healthy rats and confirms that administration of cyclophosphamide in the positive control group resulted in the expected effect. All EEFCP doses administered to the animals during 28 consecutive days presented damage index and damage frequency similar to the negative control and different from the positive control. Therefore, most cells observed for all EEFCP-treated groups did not show DNA damage, confirming that the extract administration did not result in genotoxic effect on treated animals.

The second cytogenetic assay performed in the present study to verify the genotoxic potential of EEFCP was the micronucleus test. This test is a biological assay performed to detect clastogenic and aneugenic agents. Currently, it is the most widely used test in the field of genetic toxicology, being widely accepted by international regulatory agencies, providing important mutagenic data (OECD, 2016b). The increased frequency of MN-PCEs plays an important role in the neoplastic development of certain tumors. In this study, there was no difference in the number of MN-PCEs between negative control and groups treated with four EEFCP doses (Figure 4a and 4b). As expected, animals treated with cyclophosphamide exhibited high frequency of MN-PCEs when compared to all other groups. These results corroborate data from the comet assay for genotoxicity and, therefore, indicate that EEFCP did not show clastogenic or aneugenic effect on bone marrow cells of rats treated with the extract for 28 consecutive days.

In addition to the clastogenic effects, the micronucleus test allows the determination of the cytotoxic effects of the test substance by analyzing the PCE/NCE

ratio in bone marrow cells. Compounds that reduce production of young (polychromatic) erythrocytes are considered cytotoxic (Bhaskar Gollapudi and McFadden, 1995). The proportional values between the two stages of cell maturation were statistically similar between the four groups treated with EEFCP and the negative control group, except for males from the EEFCP 125 mg/kg group (Figure 5a and 5b). These results indicate that EEFCP is not capable of affecting the production of new erythrocytes and, therefore, is not cytotoxic for this type of cell. In contrast, a possible dose-dependent cytoprotective effect exerted by the extract was observed through the results, since females from the EEFCP 1000 mg/kg group and males from the EEFCP 500 mg/kg and the EEFCP 1000 mg/kg groups showed significant increase in relation to the PCE/NCE ratio. This result encourages the continuity of studies with EEFCP to test the antigenotoxic effects of the extract. Many compounds with antimutagenic and anticarcinogenic potential are found in medicinal plants (Aruoma, 2003; Ferguson, 2001; Surh and Ferguson, 2003). Therefore, there is a need for research in the field of toxicological genetics seeking to reveal new antimutagenic agents that reduce the genotoxic effects of mutagenic and carcinogenic factors.

Another assay carried out in the present study was SMART. This assay evaluates LOH resulting from genotoxicity (Fragiorgio *et al.*, 2008; Graf *et al.*, 1984; Vogel *et al.*, 1998). Flies, specifically *D. melanogaster*, carrying heterozygous recessive mutations for multiple wing hairs (*mwh* and *flr*³ phenotypes) are exposed to a test substance. In the present study, the results for the offspring of the ST crossing showed that the negative control (treated with vehicle) presented reduced frequency in relation to the total number of mutant spots per individual, while in the positive control (treated with doxorubicin), the total frequency of spots was too high, as expected. In addition, for EEFCP-treated groups, the frequency of clone formation per individual did not

differ from the negative control. In the offspring from the HB crossing, which exhibit high xenobiotic biotransformation capacity due to overexpression of the family of cytochrome P450 enzymes, the frequency of mutant spots in the negative control group was lower than that in the positive control group, as expected. In EEFCP-treated groups, the frequency of mutant spots did not differ statistically from the negative control. These data suggest that the extract does not present genotoxic activity and corroborate results obtained with the comet assay and micronucleus test.

Previous studies have shown that visual inspection of hair phenotypes on the wings of adult flies allows the characterization of LOH. In addition, the SMART test detects associated genotoxicity with biotransformed substances (Hu *et al.*, 2004; Parvathi *et al.*, 2011), as well as antigenotoxic effects (Abraham and Graf, 1996; Yun *et al.*, 2000). Therefore, it could be suggested that, in addition to the fact that the extract did not exert genotoxic effect, since there was no significant difference in the phenotypes of wings treated with EEFCP when compared to the negative control, the biotransformation metabolites generated from EEFCP also did not present genotoxic effects, since in the offspring of the HB crossing, the frequency of mutant spots did not differ statistically from the negative control, demonstrating the safety of the extract at the doses tested in both the comet and micronucleus tests and in the SMART test.

Several plants with ethnopharmacological and nutritional importance were evaluated for genotoxic potential in recent years. For example, *Acrocomia aculeata* (Traesel *et al.*, 2015), *Attalea phalerata* (De Lima *et al.*, 2016) and *Caryocar brasiliense* (Traesel *et al.*, 2017) fruits showed low genotoxicity through the comet and micronuclei assays. However, this does not rule out the possibility of other fruits consumed by the world population to present significant genetic toxicity. In the last two decades, 458 studies evaluated the genotoxic potential of medicinal plants, and

genotoxic activity was reported in 28.4% of them (Sponchiado *et al.*, 2016). This high incidence of positive results demonstrates the importance of toxicological evaluations of plants consumed by the population and reinforces the necessity of demonstrating safety in the consumption of these plants.

5. Conclusion

In the experimental conditions used in the present study, our results provide the first evidence that orally administered EEFCP (gavage) is not genotoxic for peripheral blood cells and has no clastogenic / aneugenic action on the bone marrow cells of rats. Biotransformation metabolites of EEFCP do not present genotoxic activity, as demonstrated by the SMART test in the offspring of the high bioactivation crossing. Phytochemical analysis of EEFCP indicated high levels of flavonoids. The results obtained provide safety data for human consumption of a plant with economic, nutritional and pharmacological importance widely consumed by the population and support the economic development obtained from *C. pubescens* fruits, as well as their byproducts.

Acknowledgments

The authors would like to thank UFGD and UNIGRAN for kindly providing the research facilities and contributing with the provision of some necessary reagents in the research, as well as Professor Claudia Andréia Lima Cardoso for the production and analysis of the extract and to the research group of Professor Silvia Aparecida Oesterreich for support.

6. References

Abraham, S.K., Graf, U., 1996. Protection by coffee against somatic genotoxicity in drosophila: Role of bioactivation capacity. *Food Chem. Toxicol.* 34, 1–14.
[https://doi.org/10.1016/0278-6915\(95\)00087-9](https://doi.org/10.1016/0278-6915(95)00087-9)

- Agrawal, P.K., 1989. Carbon-13 NMR of Flavonoids., 1th ed. Elsevier Science, Amsterdam.
- Andrade, H.R.R., Reguly, M.L., Lehmann, M., 2004. Wing somatic mutation and recombination test drosophila cytogenetics protocols. Methods in molecular biology., in: Henderson, D.S. (Ed.), Drosophila Cytogenetics Protocols. Humana Press Inc, Totowa, New Jersey, pp. 389–412.
- Annangi, B., Bonassi, S., Marcos, R., Hernández, A., 2016. Biomonitoring of humans exposed to arsenic, chromium, nickel, vanadium, and complex mixtures of metals by using the micronucleus test in lymphocytes. Mutat. Res. - Rev. Mutat. Res. 770, 140–161. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2016.03.003>
- ANVISA, 2013. Guia para a condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos. Versão 2.
- Aruoma, O.I., 2003. Methodological considerations for characterizing potential antioxidant actions of bioactive components in plant foods. Mutat. Res. - Fundam. Mol. Mech. Mutagen. 523–524, 9–20. [https://doi.org/10.1016/S0027-5107\(02\)00317-2](https://doi.org/10.1016/S0027-5107(02)00317-2)
- Barbosa, J., 2009. Campomanesia lineatifolia Ruiz e Pav.: Estudo fitoquímico e avaliação da atividade antioxidante [dissertation]. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- Bhaskar Gollapudi, B., McFadden, L.G., 1995. Sample size for the estimation of polychromatic to normochromatic erythrocyte ratio in the bone marrow micronucleus test. Mutat. Res. Lett. 347, 97–99. [https://doi.org/10.1016/0165-7992\(95\)90076-4](https://doi.org/10.1016/0165-7992(95)90076-4)
- Bonilla, A., Duque, C., Garzon, C., Takaishi, Y., Yamaguchi, K., Hara, N., Fujimoto, Y., 2005. Champanones, Yellow Pigments from the Seeds of Champa (Campomanesia lineatifolia). Phytochemistry 66, 1736–1740. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2005.05.025>
- Byrne, L.T., Cannon, J.R., Gawad, D.H., Joshi, B.S., Skelton, B.W., Toia, R.F., White, A.H., 1982. The crystal structure of (S)-(-)-6-Bromo-5,7-dihydroxy8-methyl-2-

phenyl-2,3-dihydro-4H-1 benzopyran-4-one [(-)-6-bromocryptostrobin] and a ¹³C N.M.R. Study of (±)-cryptostrobin and related substances. Revision of the structures of the natural products (±). *Aust. J. Chem.* 35, 1851–1858.

- Cardoso, C.A.L., Silva, J.R.M., Kataoka, V.M.F., Brum, C.S., Poppi, N.R., 2008. Avaliação da atividade antioxidante, toxicidade e composição química por CG-EM do extrato hexânico das folhas de *Campomanesia pubescens*. *Rev. Ciencias Farm. Basica e Apl.* 29, 297–301.
- Chan, K., 2003. Some aspects of toxic contaminants in herbal medicines. *Chemosphere* 52, 1361–1371. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(03\)00471-5](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(03)00471-5)
- Cook, N.C., Samman, S., 1996. Flavonoids—Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. *J. Nutr. Biochem.* 7, 66–76. [https://doi.org/10.1016/S0955-2863\(95\)00168-9](https://doi.org/10.1016/S0955-2863(95)00168-9)
- Coutinho, I.D., Cardoso, C.A.L., Ré-Poppi, N., Melo, A.M., Vieira, M.D.C., Honda, N.K., Coelho, R.G., 2009. Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS) and evaluation of antioxidant and antimicrobial activities of essential oil of *Campomanesia adamantium* (Cambess.) O. Berg (Guavira). *Brazilian J. Pharm. Sci.* 45, 767–776. <https://doi.org/10.1590/S1984-82502009000400022>
- De Lima, F.F., Menegati, S.E.L.T., Traesel, G.K., De Araújo, F.H.S., Lescano, C.H., Peixoto, S.M., Mao Silva, F.A., Vieira, S.C.H., Vieira, M.D.C., Oesterreich, S.A., 2016. Study on the cytotoxic, genotoxic and clastogenic potential of *Attalea phalerata* Mart. Ex Spreng. Oil pulp in vitro and in vivo experimental models. *PLoS One* 11, 1–11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0165258>
- Ekor, M., 2014. The growing use of herbal medicines: Issues relating to adverse reactions and challenges in monitoring safety. *Front. Neurol.* 4, 1–10. <https://doi.org/10.3389/fphar.2013.00177>
- El-khamisy, S.F., Caldecott, K.W., 2006. TDP1-dependent DNA single-strand break repair and neurodegeneration. *Mutagenesis* 21, 219–224. <https://doi.org/10.1093/mutage/gel024>
- Farsi, E., Shafaei, A., Hor, S., Ahamed, M., Yam, M., Asmawi, M., Ismail, Z., 2013. Genotoxicity and acute and subchronic toxicity studies of a standardized methanolic extract of *Ficus deltoidea* leaves. *Clinics* 68, 865–875.

[https://doi.org/10.6061/clinics/2013\(06\)23](https://doi.org/10.6061/clinics/2013(06)23)

- Ferguson, L.R., 2001. Role of plant polyphenols in genomic stability. *Mutat. Res. - Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* 475, 89–111. [https://doi.org/10.1016/S0027-5107\(01\)00073-2](https://doi.org/10.1016/S0027-5107(01)00073-2)
- Fragiorge, E.J., Rezende, A.A.A. d, Graf, U., Spanó, M.A., 2008. Comparative genotoxicity evaluation of imidazolinone herbicides in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Food Chem. Toxicol.* 46, 393–401. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.08.022>
- Frei, H., Würigler, F.E., 1988. Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila* assays indicate a positive, negative, or inconclusive result. *Mutat. Res. Mutagen. Relat. Subj.* 203, 297–308. [https://doi.org/10.1016/0165-1161\(88\)90019-2](https://doi.org/10.1016/0165-1161(88)90019-2)
- Graf, U., van Schaik, N., 1992. Improved high bioactivation cross for the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Mutat. Res.* 271, 59–67. [https://doi.org/10.1016/0165-1161\(92\)90032-H](https://doi.org/10.1016/0165-1161(92)90032-H)
- Graf, U., Würigler, F.E., Katz, A.J., Frei, H., Juon, H., Hall, C.B., Kale, P.G., 1984. Somatic Mutation and Recombination Test in *Drosophila melanogaster*. *Environ. Mutagen.* 6, 153–188. <https://doi.org/10.1002/em.2860060206>
- Guerrero, F.M.G., Zimmerman, L.R., Cardoso, E. V., Cardoso, C.A.L., Perdomo, R.T., Carollo, C.A., Guerrero, A.T., 2010. Investigação da Toxicidade Crônica das Folhas de Guavira (*Campomanesia pubescens*) em Ratos Machos. *Rev. Fitos* 5, 64–72.
- Guzmán-Rincon, J., Graf, U., 1995. *Drosophila melanogaster* Somatic Mutation and Recombination Test as a biomonitor, in: Butterworth, F.M., Corkum, C.D., Guzmán-Rincon, J. (Eds.), *Biomonitoring and Biomarkers as Indicators of Environmental Change*. Plenum, New York, pp. 169–181.
- Harvey, A., 2000. Strategies for discovering drugs from previously unexplored natural products. *Drug Discov. Today* 5, 294–300. [https://doi.org/10.1016/S1359-6446\(00\)01511-7](https://doi.org/10.1016/S1359-6446(00)01511-7)
- Hu, T., Gibson, D.P., Carr, G.J., Torontali, S.M., Tiesman, J.P., Chaney, J.G., Aardema, M.J., 2004. Identification of a gene expression profile that discriminates indirect-

- acting genotoxins from direct-acting genotoxins. *Mutat. Res. - Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* 549, 5–27. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2003.11.012>
- Kastembaum, M.A., Bowman, K.O., 1970. Tables to determining the statistical significance of mutation frequencies. *Mutat. Res.* 9, 527–549. [https://doi.org/10.1016/0027-5107\(70\)90124-7](https://doi.org/10.1016/0027-5107(70)90124-7)
- Klafke, J.Z., da Silva, M.A., Panigas, T.F., Belli, K.C., de Oliveira, M.F., Barichello, M.M., Rigo, F.K., Rossato, M.F., Soares dos Santos, A.R., Pizzolatti, M.G., Ferreira, J., Viçcili, P.R.N., 2010. Effects of *Campomanesia xanthocarpa* on biochemical, hematological and oxidative stress parameters in hypercholesterolemic patients. *J. Ethnopharmacol.* 127, 299–305. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2009.11.004>
- Kumar, S., Gupta, A., Pandey, A.K., 2013a. *Calotropis procera* Root Extract Has the Capability to Combat Free Radical Mediated Damage. *ISRN Pharmacol.* 2013, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2013/691372>
- Kumar, S., Mishra, A., Pandey, A.K., 2013b. Antioxidant mediated protective effect of *Parthenium hysterophorus* against oxidative damage using in vitro models.pdf. *BMC Complement. Altern. Med.* 13, 1–9. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-13-1>
- Kumar, S., Pandey, A.K., 2013. Phenolic Content, Reducing Power and Membrane Protective Activities of *Solanum xanthocarpum* Root Extracts. *Vegetos* 26, 301–107. <https://doi.org/10.5958/j.2229-4473.26.1.043>
- Kuskoski, E.M., Asuero, A.G., Morales, M.T., Fett, R., 2006. Frutos tropicais silvestres e polpas de frutas congeladas: atividade antioxidante, polifenóis e antocianinas. *Ciência Rural* 36, 1283–1287. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782006000400037>
- Lázaro, D.C., López, Y.I., Vázquez, A.I.F., Odio, A.D., González, J.E., Sánchez, L.M., Delgado, N.G., 2010. Genotoxic assessment of aqueous extract of *rhizophora mangle* L. (mangle rojo) by spermatozoa head assay. *Rev. Cuba. Plantas Med.* 15, 18–26.
- Leopoldini, M., Russo, N., Chiodo, S., Toscano, M., 2006. Iron chelation by the powerful antioxidant flavonoid quercetin. *J. Agric. Food Chem.* 54, 6343–6351. <https://doi.org/10.1021/jf060986h>

- Lin, J.Y., Tang, C.Y., 2007. Determination of total phenolic and flavonoid contents in selected fruits and vegetables, as well as their stimulatory effects on mouse splenocyte proliferation. *Food Chem.* 101, 140–147.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.01.014>
- Lombardot, B., Oh, C.T., Kwak, J., Genovesio, A., Kang, M., Hansen, M.A.E., Han, S.J., 2015. High-throughput in vivo genotoxicity testing: An automated readout system for the somatic mutation and recombination test (SMART). *PLoS One* 10, 1–11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0121287>
- Lorenzi, H., Sartori, S., Bacher, L.B., Lacerda, M., 2006. Frutas brasileiras e exóticas cultivadas (de consumo in natura). Instituto Platarum, São Paulo.
- Madalosso, R.C., Coelho, M. de M., Tagliati, C.A., Castilho, R.O., 2011. Avaliação da toxicidade aguda e da atividade gastroprotetora de extratos de *Campomanesia lineatifolia* Ruiz & Pav. em roedores [dissertation]. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- Markman, B.E.O., Bacchi, E.M., Kato, E.T.M., 2004. Antiulcerogenic effects of *Campomanesia xanthocarpa*. *J. Ethnopharmacol.* 94, 55–57.
<https://doi.org/10.1016/j.jep.2004.04.025>
- Muhammad, H., Gomes-Carneiro, M.R., Poa, K.S., De-Oliveira, A.C.A.X., Afzan, A., Sulaiman, S.A., Ismail, Z., Paumgarten, F.J.R., 2011. Evaluation of the genotoxicity of *Orthosiphon stamineus* aqueous extract. *J. Ethnopharmacol.* 133, 647–653. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2010.10.055>
- Munari, C.C., Alves, J.M., Bastos, J.K., Tavaresa, D.C., 2010. Evaluation of the genotoxic and antigenotoxic potential of *Baccharis dracunculifolia* extract on V79 cells by the comet assay. *J. Appl. Toxicol.* 30, 22–28.
<https://doi.org/10.1002/jat.1467>
- Mustafa, K., B.Perry, N., T.Weavers, R., 2005. Lipophilic C-methylflavonoids with no B-ring oxygenation in *Metrosideros* species (Myrtaceae). *Biochem. Syst. Ecol.* 33, 1049–1059.
- Nersesyan, A., Fenech, M., Bolognesi, C., Mišík, M., Setayesh, T., Wultsch, G., Bonassi, S., Thomas, P., Knasmüller, S., 2016. Use of the lymphocyte cytokinesis-

- block micronucleus assay in occupational biomonitoring of genome damage caused by in vivo exposure to chemical genotoxins: Past, present and future. *Mutat. Res. - Rev. Mutat. Res.* 770, 1–11.
<https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2016.05.003>
- OECD, 2016a. Oecd Guideline for the testing of chemicals. N° 489: In Vivo Mammalian Alkaline Comet Assay.
- OECD, 2016b. OECD Guideline for the testing of chemicals. N° 474: Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test.
- Osorio, C., Alarcon, M., Moreno, C., Bonilla, A., Barrios, J., Garzon, C., Duque, C., 2006. Characterization of odor-active volatiles in champa (*Campomanesia lineatifolia* R. & P.). *J. Agric. Food Chem.* 54, 509–516.
<https://doi.org/10.1021/jf052098c>
- Palyvoda, O., Polańska, J., Wygoda, A., Rzeszowska-wolny, J., 2003. DNA damage and repair in lymphocytes of normal individuals and cancer patients: studies by the comet assay and. *Acta Biochim. Pol.* 50, 181–190. <https://doi.org/035001181>
- Parvathi, V.D., Ravi, M., Paul, S.F.D., 2011. Anthracycline (epirubicin) induced mutation studies in *Drosophila melanogaster*. *Drosoph. Inf. Serv.* 94, 53–61.
- Pavan, F.R., Leite, C.Q.F., Coelho, R.G., Coutinho, I.D., Honda, N.K., Cardoso, C.A.L., Vilegas, W., Leite, S.R. de A., Sato, D.N., 2009. Evaluation of anti-mycobacterium tuberculosis activity of *campomanesia adamantium* (myrtaceae). *Quim. Nova* 32, 1222–1226. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422009000500026>
- Prado, L.C. da S., Silva, L.B.B. da, 2013. Avaliação da atividade gastroprotetora do extrato aquoso das folhas de *Eugenia dysenterica* DC. e *Campomanesia pubescens* O. Berg [dissertation]. Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas da Universidade Federal de Uberlândia.
- Regner, G.G., Giancesini, J., Von Borowski, R.G., Silveira, F., Semedo, J.G., Ferraz, A. de B.F., Wiilland, E., Von Poser, G., Allgayer, M., Picada, J.N., Pereira, P., 2011. Toxicological evaluation of *Pterocaulon polystachyum* extract: A medicinal plant with antifungal activity. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 31, 242–249.
<https://doi.org/10.1016/j.etap.2010.11.003>
- Rice-evans, C.A., Miller, N.J., Bolwell, P.G., Bramley, P.M., Pridham, J.B., 1995. The

- relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. *Free Radic. Res.* 22, 375–383. <https://doi.org/10.3109/10715769509145649>
- Robbers, J.E., Speedie, M.K., Tyler, V.E., 1996. *Pharmacognosy and Pharmacobiotechnology*. Williams & Wilkins, Baltimore.
- Rocha, E.O., Morais, S.A.L., Chang, R., 2011. Avaliação dos constituintes fenólicos e voláteis, atividade antioxidante e antimicrobiana de *Campomanesia pubescens* (DC.) O. Berg (Gabioba) [dissertation]. Programa de Pós-graduação do Instituto de Química. Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia-MG.
- Sarikaya, R., Selvi, M., Erkoç, F., 2012. Evaluation of potential genotoxicity of five food dyes using the somatic mutation and recombination test. *Chemosphere* 88, 974–979. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.03.032>
- Schmeda-Hirschmann, G., 1995. Flavonoids from *Calycorectes*, *Campomanesia*, *Eugenia* and *Hexachlamys* species. *Fitoterapia* 66, 373–441.
- Solladié, G., Gehrold, N., Maignan, J., 1999. Biomimetic Synthesis of the Flavanone Leridol, Revision of the Structure of the Natural Product. *European J. Org. Chem.* 2309–2314. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-0690\(199909\)1999:2309::AID-EJOC2309>3.0.CO;2-3](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-0690(199909)1999:2309::AID-EJOC2309>3.0.CO;2-3)
- Sponchiado, G., Adam, M.L., Silva, C.D., Silva Soley, B., De Mello-Sampayo, C., Cabrini, D.A., Correr, C.J., Otuki, M.F., 2016. Quantitative genotoxicity assays for analysis of medicinal plants: A systematic review. *J. Ethnopharmacol.* 178, 289–296. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2015.10.026>
- Srivastava, R., Shaw, A.K., Kulshreshtha, D.K., 1995. Triterpenoids and chalcone from *Syzygium samarangense*. *Phytochemistry* 38, 687–689. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(94\)00739-G](https://doi.org/10.1016/0031-9422(94)00739-G)
- Surh, Y.J., Ferguson, L.R., 2003. Dietary and medicinal antimutagens and anticarcinogens: Molecular mechanisms and chemopreventive potential - Highlights of a symposium. *Mutat. Res. - Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* 523–524, 1–8. [https://doi.org/10.1016/S0027-5107\(02\)00343-3](https://doi.org/10.1016/S0027-5107(02)00343-3)
- Traesel, G.K., Araújo, F.H.S. de, Castro, L.H.A., Lima, F.F. de, Menegati, S.E.L.T., Justi, P.N., Kassuya, C.A.L., Cardoso, C.A.L., Argandon, E.J.S., et al., 2017. Safety Assessment of Oil from *Pequi* (*Caryocar brasiliense* Camb.): Evaluation of the Potential Genotoxic and

- Clastogenic Effects. *J. Med. Food* 0, 1–8. <https://doi.org/10.1089/jmf.2017.0021>
- Traesel, G.K., Castro, L.H., Silva, P. V., Muzzi, R.M., Kassuya, C.A., Arena, A.C., Oesterreich, A.S., 2015. Assessment of the cytotoxic, genotoxic, and mutagenic potential of *Acrocomia aculeata* in rats. *Genet Mol Res* 14, 585–596.
- Turolla, M.S. dos R., Nascimento, E. de S., 2006. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. *Brazilian J. Pharm. Sci.* 42, 289–306. <https://doi.org/10.1590/S1516-93322006000200015>
- Vallilo, M.I., Lamardo, L.C.A., Gaberlotti, M.L., Oliveira, E. De, Moreno, P.R.H., 2006. Composição química dos frutos de *Campomanesia adamantium* (Cambessédes) O.Berg. *Ciência e Tecnol. Aliment.* 26, 805–810. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612006000400015>
- Vallilo, M.I., Moreno, P.R.H., Oliveira, E. de, Lamardo, L.C.A., Garbelotti, M.L., 2008. Composição química dos frutos de *Campomanesia xanthocarpa* Berg-Myrtaceae. *Ciência e Tecnol. Aliment.* 28, 231–237. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612008000500035>
- Varanda, E.A., Pozetti, G.L., Lourenço, M.V., Vilegas, W., Raddi, M.S.G., 2002. Genotoxicity of *Brosimum gaudichaudii* measured by the Salmonella/microsome assay and chromosomal aberrations in CHO cells. *J. Ethnopharmacol.* 81, 257–264. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(02\)00089-2](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(02)00089-2)
- Vogel, E.W., Graf, U., Frei, H.J., Nivard, M.M., 1998. The results of assays in *Drosophila* as indicators of exposure to carcinogens. *IARC Sci. Publ.* 146, 427–470.
- WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION), 2004. WHO guidelines on safety monitoring of herbal medicines in pharmacovigilance systems. https://doi.org/http://www.regione.emilia-romagna.it/agenziasan/mnc/pdf/documenti/oms/who_guid_pharmacovig.pdf
- Yun, H., Park, K., Lee, W., Science, F., 2000. Antimutagenic effects of genistein in *drosophila* somatic mutation assaying system. *J. Korean Assoc. Cancer Prev.* 5, 135–143. <https://doi.org/10.1089/jmf.2017.0021>

Tables

Table 1. Effects of treatment with ethanolic extract of *C. pubescens* fruits and cyclophosphamide (positive control) on the index and frequency DNA damage using the peripheral blood of female and male Wistar rats.

GROUPS	COMET CLASS				DAMAGE INDEX
	0	1	2	3	
Female					
Negative Control	89.80 ± 0.37	8.40 ± 0.40	1.80 ± 0.58	0.00 ± 0.00	12.00 ± 0.89
Positive Control	11.00 ± 1.10 ^A	32.60 ± 1.17 ^B	34.60 ± 1.75 ^C	20.60 ± 2.62 ^D	163.60 ± 5.03 ^{**}
125 mg/Kg/bw	93.20 ± 0.97	4.80 ± 0.80	1.60 ± 0.40	0.00 ± 0.00	8.00 ± 0.77
250 mg/Kg/bw	89.00 ± 1.67	9.00 ± 1.38	2.00 ± 0.71	0.00 ± 0.00	13.00 ± 2.17
500 mg/Kg/bw	86.80 ± 3.02	9.40 ± 2.62	3.40 ± 0.75	0.40 ± 0.24	17.40 ± 3.31
1000 mg/Kg/bw	87.00 ± 2.59	11.60 ± 2.86	1.40 ± 0.40	0.00 ± 0.00	14.40 ± 2.36
Male					
Negative Control	91.20 ± 1.16	7.40 ± 0.81	1.40 ± 0.51	0.00 ± 0.00	10.20 ± 1.59
Positive Control	12.00 ± 0.89 ^A	37.20 ± 1.32 ^B	35.20 ± 2.44 ^C	15.60 ± 2.44 ^D	154.40 ± 1.96 ^{**}
125 mg/Kg/bw	93.80 ± 0.66	4.60 ± 0.51	1.60 ± 0.24	0.00 ± 0.00	7.80 ± 0.86
250 mg/Kg/bw	92.20 ± 1.24	6.00 ± 1.05	1.80 ± 0.37	0.00 ± 0.00	9.60 ± 1.50
500 mg/Kg/bw	89.40 ± 2.23	8.20 ± 1.62	2.40 ± 0.68	0.00 ± 0.00	13.00 ± 2.86
1000 mg/Kg/bw	89.00 ± 1.41	9.00 ± 1.00	2.00 ± 0.63	0.00 ± 0.00	13.00 ± 1.95

Data expressed as mean ± SEM of comet classes, index and frequency of DNA damage. ^A Differs from all other groups for the class 0 parameter;

^B Differs from all other groups for the class 1 parameter; ^C Differs from all other groups for the class 2 parameter; ^D Differs from all other groups

for the class 3 parameter; ** Differs from all other groups for the damage index parameter. One-way ANOVA, Duncan's *post hoc* ($p < 0.001$).

Damage index: type of damage x number of cells with damage.

Table 2. Frequency of mutant spots observed in the marked transheterozygous descendants of *Drosophila melanogaster* derived from the standard cross (ST) and high bioactivation cross (HB) after treatment with ethanolic extract of *C. pubescens* fruits.

Genotypes and treatments (mg/mL)	No. of flies (N)	Spots per individual (No. Spots) statistical diagnosis ^a				Total Spots
		Small single spots (1-2 cells) ^b m = 2	Large single spots (>2 cells) ^b m = 5	Twin spots m = 5	Total spots m = 2	
mwh/fler³						
ST						
CN	20	0.30 (06)	0.00 (00)	0.00 (00)	0.30 (06)	06
DXR	20	4.85 (97) +	3.05 (61) +	3.15 (63) +	11.05 (221) +	217
EEFCP 2,5	20	0.30 (06) -	0.00 (00) -	0.00 (00) -	0.60 (06) -	06
EEFCP 5,0	20	0.45 (09) -	0.05 (01) -	0.05 (01) -	0.55 (11) i	11
EEFCP 10,0	20	0.35 (07) -	0.05 (01) -	0.05 (01) -	0.45 (09) -	09
HB						
CN	20	0.30 (06)	0.15 (03)	0.10 (02)	0.55 (11)	11
DXR	20	2.65 (53) +	3.10 (62) +	1.70 (34) +	7.45 (149) +	147
EEFCP 2,5	20	0.20 (04) -	0.05 (01) -	0.00 (00) -	0.25 (05) -	05
EEFCP 5,0	20	0.20 (04) -	0.20 (04) -	0.00 (00) -	0.40 (08) -	08
EEFCP 10,0	20	0.25 (05) +	0.15 (03) -	0.00 (00) -	0.40 (08) -	08

^a Statistical diagnosis according to Frei and Würzler (1988): + positive; - negative; i inconclusive; m, multiplication factor for the evaluation of significantly negative results. Significance levels $\alpha=\beta=0.05$; ^b including rare simple *flr3* spots; ^c considering *mwh* clones for simple *mwh* spots and for the twin spots.

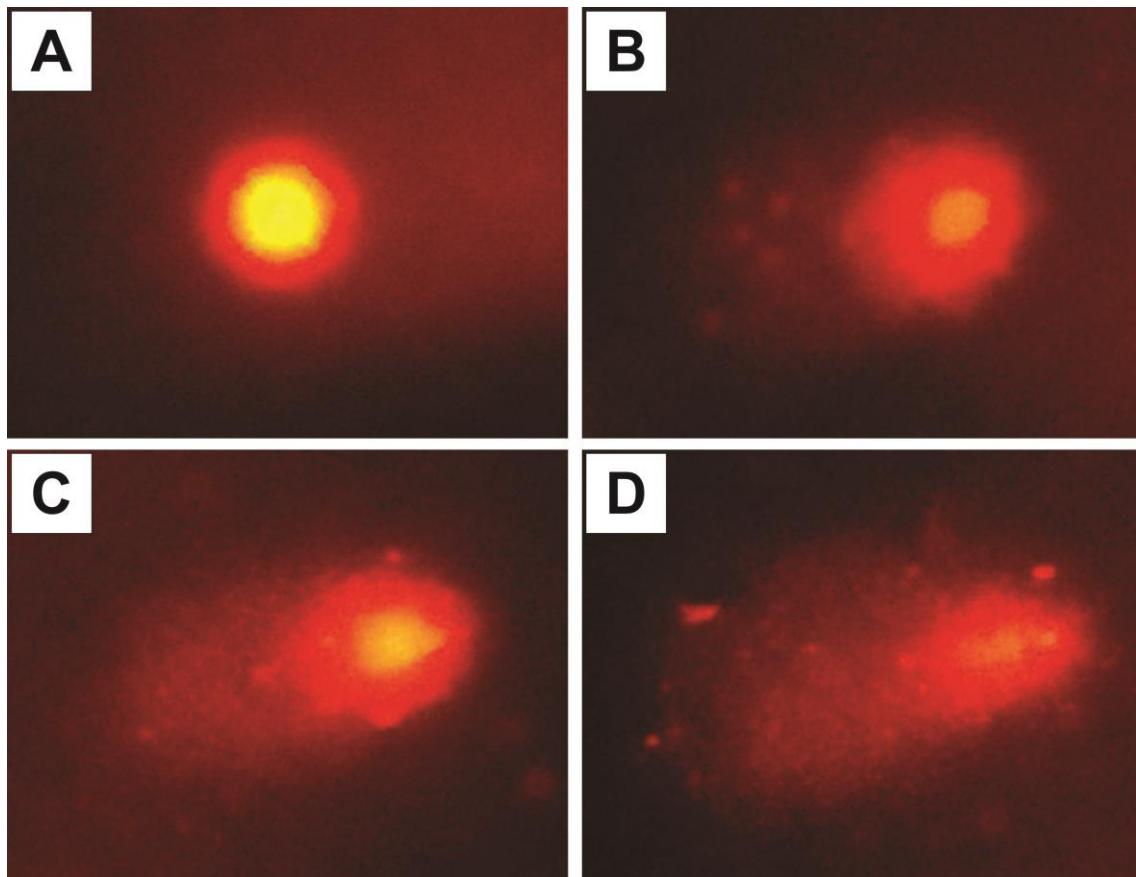
Figures

Figure 1. Classification of comets in peripheral blood cells.

A) Class 0 (no damage); **B)** class 1 (comet tail shorter than the diameter of the nucleoid); **C)** class 2 (comet tail once or twice the diameter of the nucleoid); and **D)** class 3 (comet tail greater than twice the size of the nucleoid). Sample of animal from the positive control group.

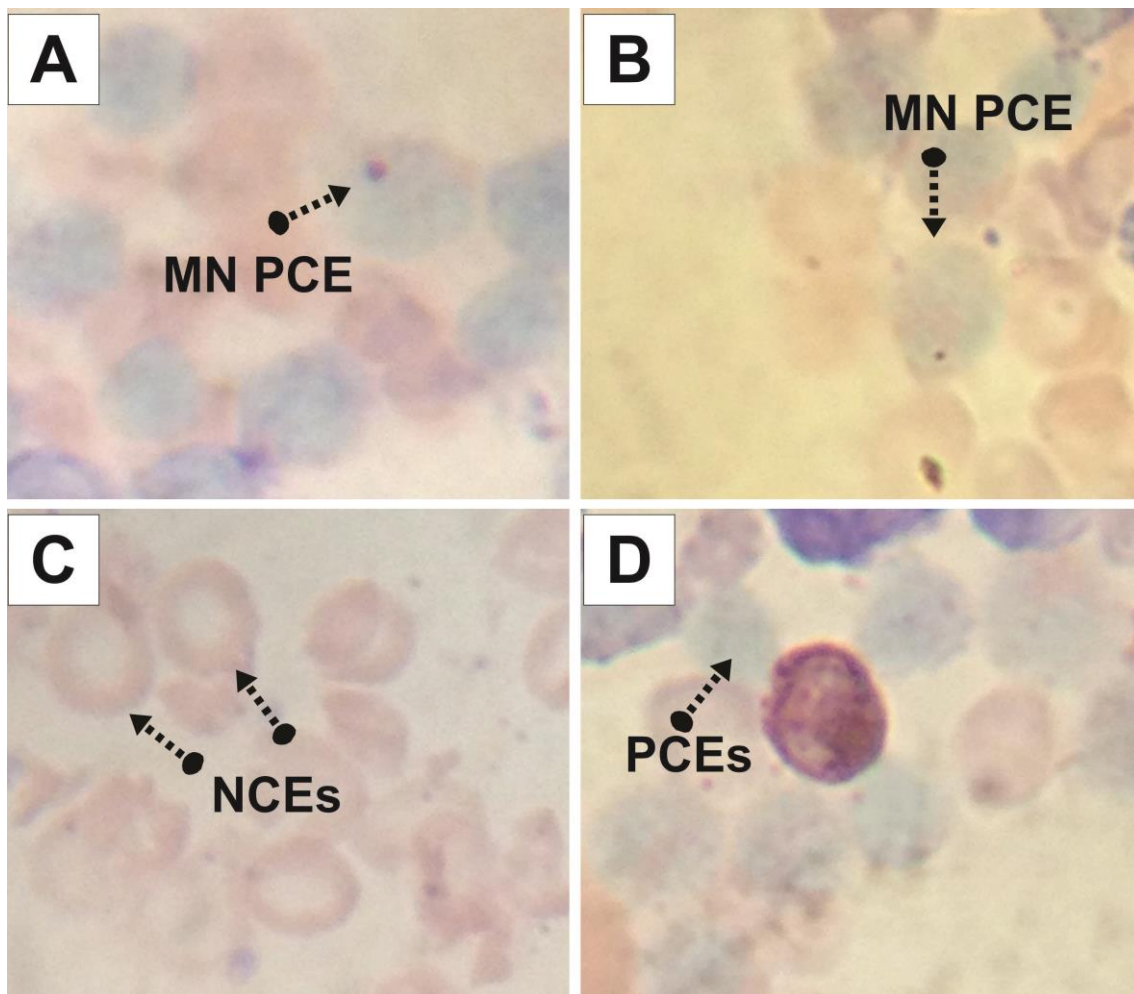


Figure 2. Erythrocytes of bone marrow.

A; B) Micronucleated polychromatic erythrocytes (MN-PCE); **C)** Normochromatic Erythrocytes (NCE) and; **D)** Polychromatic Erythrocyte (PCE). Sample of animal from the positive control group.

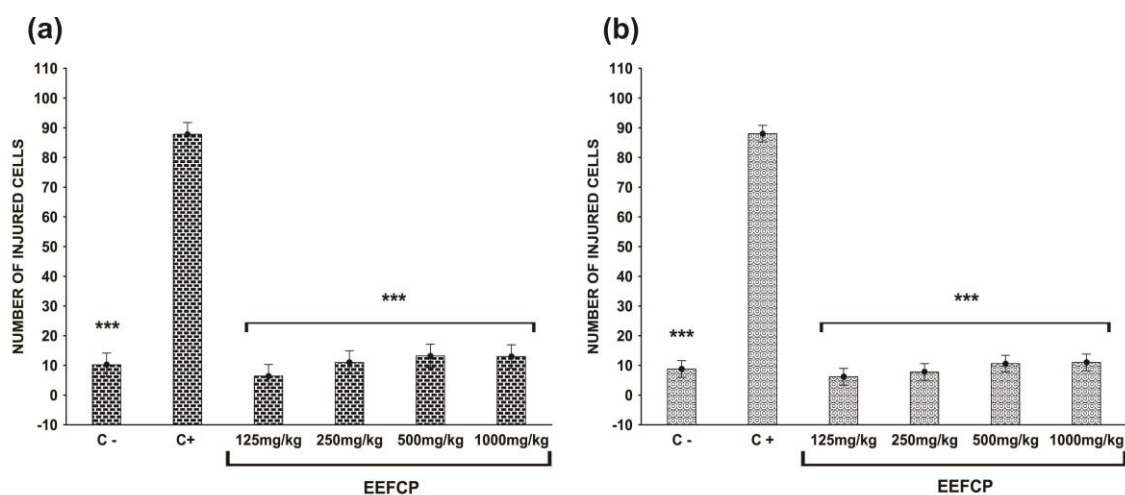


Figure 3. Effects of treatment with EEFCP and cyclophosphamide (positive control) on the DNA damage frequency using the peripheral blood of female (a) and male (b) Wistar rats.

Data expressed as means \pm SEM (n=5) of the number of cells injured in the comet assay. *** Differs positive control group, $p < 0,01$ (one-way ANOVA, Duncan's *post hoc*). Damage frequency: number of cells with damage in 100 cells analyzed.

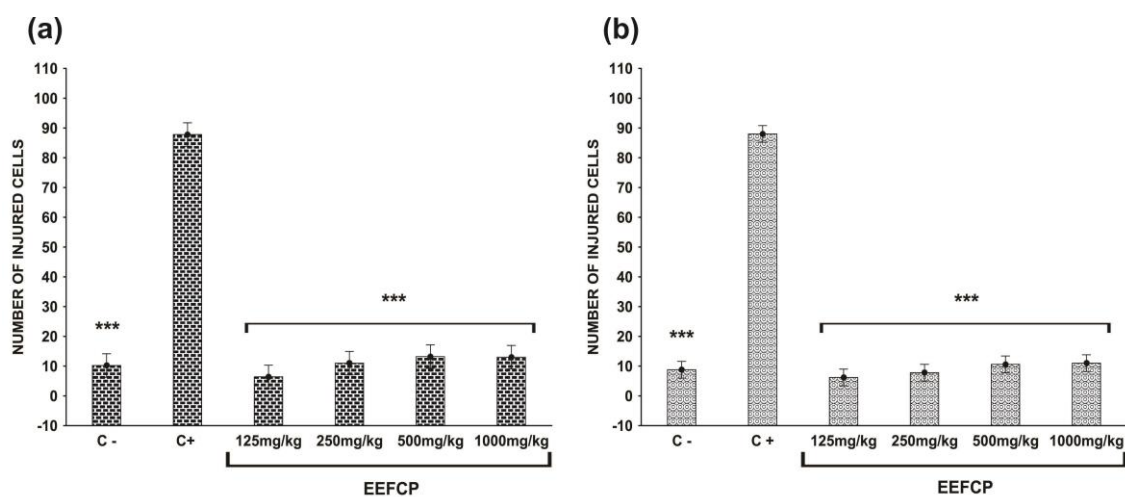


Figure 4. Effects of treatment with EEFCP and cyclophosphamide (positive control) on the counts of MN-PCEs using the bone marrow of female (a) and male (b) Wistar rats.

Data expressed as means \pm SEM (n=5) of the number of MN-PCEs in the micronucleus assay. *** Differs positive control group, $p < 0,01$ (one-way ANOVA, Duncan's *post*

hoc). A total of 2000 cells were analyzed in each animal. MN-PCEs, micronucleated polychromatic erythrocytes.

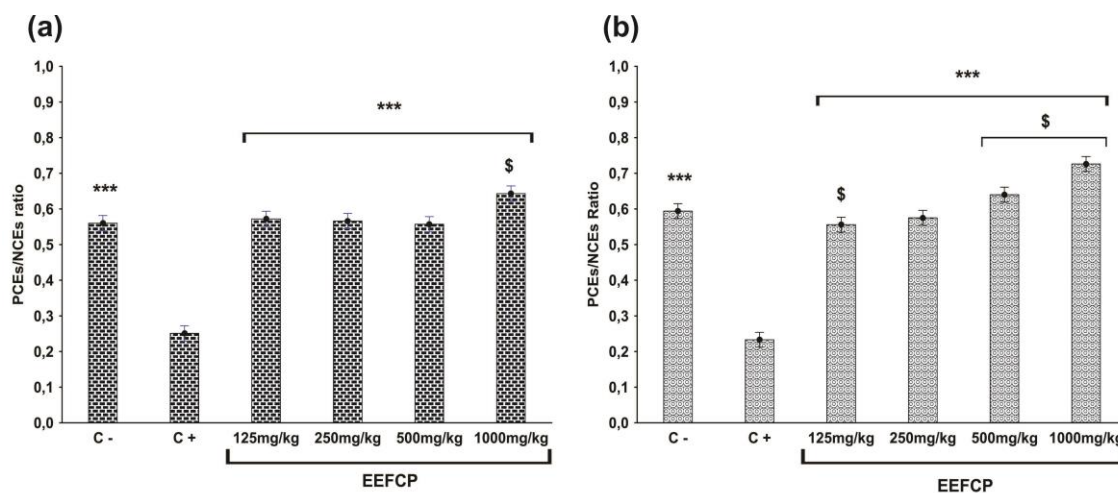


Figure 5. Effects of treatment with EEFCP and cyclophosphamide (positive control) on the PCEs/NCEs ratio using the bone marrow of female (a) and male (b) Wistar rats.

Data expressed as means \pm SEM (n=5) of the PCEs/NCEs ratio in the micronucleus assay. *** Differs positive control group; \$ Differs negative control group; $p < 0,01$ (one-way ANOVA, Duncan's *post hoc*). A total of 200 cells were analyzed in each animal. PCEs/NCEs, polychromatic to normochromatic erythrocytes.

6.4. Artigo IV: The ethanolic extract obtained from *Campomanesia pubescens* (D.C.) O. BERG fruits exerts anxiolytic and antidepressant effects on chronic mild stress model and on anxiety models in Wistar rats: behavioral evidences.

Publicado no periódico “*Nutritional Neuroscience*” (Fator de Impacto 3,765, Qualis B1 na área Medicina II). Data do aceite: 11/04/2018.

DOI: 10.1080/1028415X.2018.1466513.

Link da publicação: <https://www.tandfonline.com/eprint/6k46As2qx3hgmR3zI6Q4/full>

7. ANEXOS

7.1. Parecer de aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
PR - REITORIA DE ENSINO DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA

Dourados-MS, 30 de outubro de 2017.

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "**Avaliação do potencial efeito antidepressivo e ansiolítico e análise da toxicidade, genotoxicidade, mutagenicidade e teratogenicidade do extrato etanólico da *Campomanesia pubescens***", registrada sob o protocolo de nº 33/2017, sob a responsabilidade de *Silvia Aparecida Oesterreich e Gustavo Roberto Villas Boas* – que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFGD) da Universidade Federal da Grande Dourados, *ad referendum*.

<i>Finalidade</i>	() Ensino (X) Pesquisa Científica
<i>Vigência da autorização</i>	01/11/2017 a 31/03/2019
<i>Espécie/linhagem/raça</i>	<i>Rattus norvegicus e Mus musculus</i>
<i>Nº de animais</i>	250 / 150 <i>Wistar</i> e 110 <i>Swiss</i>
<i>Peso/idade</i>	30 a 50 dias
<i>Sexo</i>	<i>Wistar</i> 55 machos e 85 fêmeas/ <i>Swiss</i> 110 machos
<i>Origem</i>	Biotério Central da Universidade Federal da Grande Dourados- UFGD e Biotério da Universidade Estadual de Maringá -UEM

Melissa Negrão Sepulveda

Melissa Negrão Sepulveda
Coordenadora CEUA

Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UFGD – Rua João Rosa Góes, 1761 – Vila Progresso.
Dourados/MS. E-mail: ceua@ufgd.edu.br

7.2. Carta de aceite do artigo submetido ao periódico *Nutritional Neuroscience*

Date: 11 Apr 2018
To: "Gustavo Roberto Villas Boas" gustavo.villasboas@gmail.com;gustavo.villasboas@ufob.edu.br
cc: anapaulastefanello@hotmail.com, bfeitosafarinelli@gmail.com, claudia@uems.br, silviaoesterreich@gmail.com, emelyarce@hotmail.com
From: "George E. Barreto" gesbarreto@gmail.com
Subject: (Nutritional Neuroscience) Your submission has been accepted

Ref.: NNS1202R2

The ethanolic extract obtained from *Campomanesia pubescens* (D.C.) O. BERG fruits exerts anxiolytic and antidepressant effects on chronic mild stress model and on anxiety models in Wistar rats: behavioral evidences.
Nutritional Neuroscience

Dear Dr. Villas Boas,

I am pleased to inform you that we have received favourable comments on the above submission, and that it is accepted for publication in *Nutritional Neuroscience*. It was accepted on 11 Apr 2018.

Thank you for submitting your work to *Nutritional Neuroscience*.

With kind regards
George E. Barreto, Ph.D.
Associate Editor
Nutritional Neuroscience

Comments from the Editors and Reviewers:

Reviewer #1: This interesting article deals with the effect of flavonoids on anxiety and depressive behavior in rats after Mild stress.

The authors modified the text to improve it as requested by the reviewers in its present form is adequate for publication. minor changes

Fig 1

Change groups:
group control, group stresses
to Control non-stressed rats
stressed rats

Colors could be changed to black, and for forced swimming a figure similar to the cilindric device will be more adequate

7.3. Carta de aceite do artigo submetido ao periódico *Food and Chemical Toxicology*

Date: Apr 28, 2018
To: "Gustavo Roberto Villas Boas" gustavo.villasboas@gmail.com,gustavo.villasboas@ufob.edu.br
cc: joseluis.domingo@urv.cat
From: "Food and Chemical Toxicology" eesserver@eesmail.elsevier.com
Reply To: "Food and Chemical Toxicology" fct@elsevier.com
Subject: Your Submission

Ms. Ref. No.: FCT-D-18-00662R2

Title: Preclinical safety evaluation of the ethanolic extract from guavira fruits (*Campomanesia pubescens* (D.C.) O. BERG) in experimental models of acute and short-term toxicity in rats
Food and Chemical Toxicology

Dear Professor Villas Boas,

I am pleased to confirm that your paper "Preclinical safety evaluation of the ethanolic extract from guavira fruits (*Campomanesia pubescens* (D.C.) O. BERG) in experimental models of acute and short-term toxicity in rats" has been accepted for publication in Food and Chemical Toxicology.

When your paper is published on ScienceDirect, you want to make sure it gets the attention it deserves. To help you get your message across, Elsevier has developed a new, free service called AudioSlides: brief, webcast-style presentations that are shown (publicly available) next to your published article. This format gives you the opportunity to explain your research in your own words and attract interest. You will receive an invitation email to create an AudioSlides presentation shortly. For more information and examples, please visit <http://www.elsevier.com/audioslides>.

NEW: Lab Resource. Did you develop one or several original cell lines during the course of your research (immortalized cells or genetically modified cell lines)? You can now submit the description of these unique cell lines to Toxicology Letters. The overarching criteria are that the unique cell lines are useful models for in vitro toxicant testing or to serve as a tool for insight into the mechanism of toxicant-induced cell injury. To submit a Lab Resource to Toxicology Letters: 1) Fill in this template http://ees.elsevier.com/toxlet/img/Lab_Resource_Template_TOXLET.docx. 2) Submit your article to <http://ees.elsevier.com/toxlet>, selecting the article type "Lab Resource".

Your accepted manuscript will now be transferred to our production department and work will begin on creation of the proof. If we need any additional information to create the proof, we will let you know. If not, you will be contacted again in the next few days with a request to approve the proof and to complete a number of online forms that are required for publication.

Thank you for submitting your work to this journal.

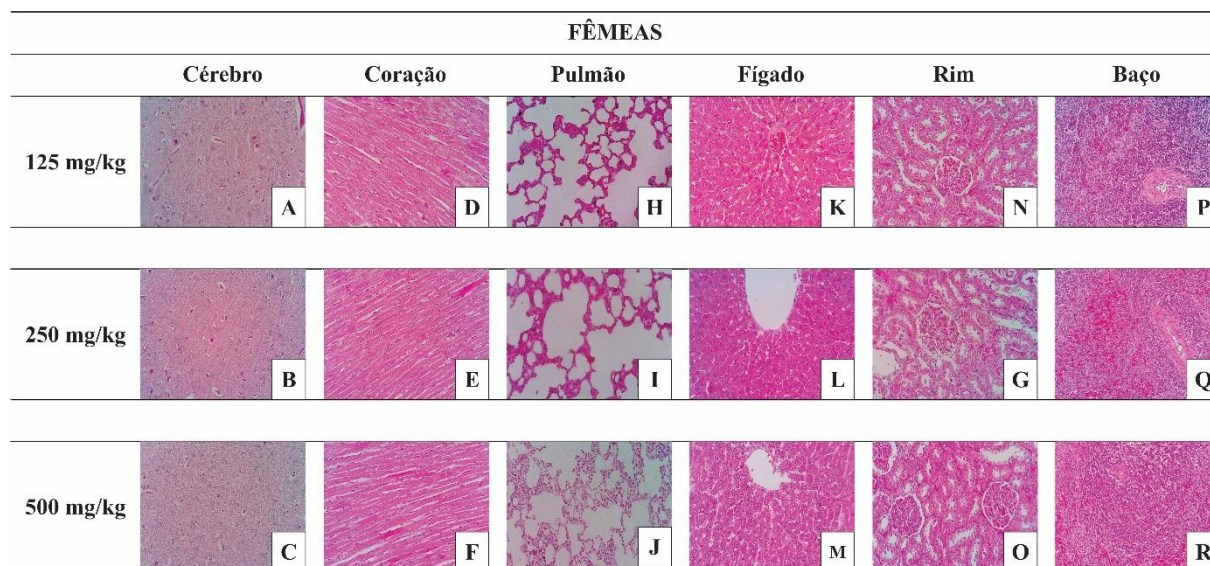
With kind regards,

Jose L. Domingo, PhD
Editor In Chief

Comments from the Editor and/or Reviewers (if available):

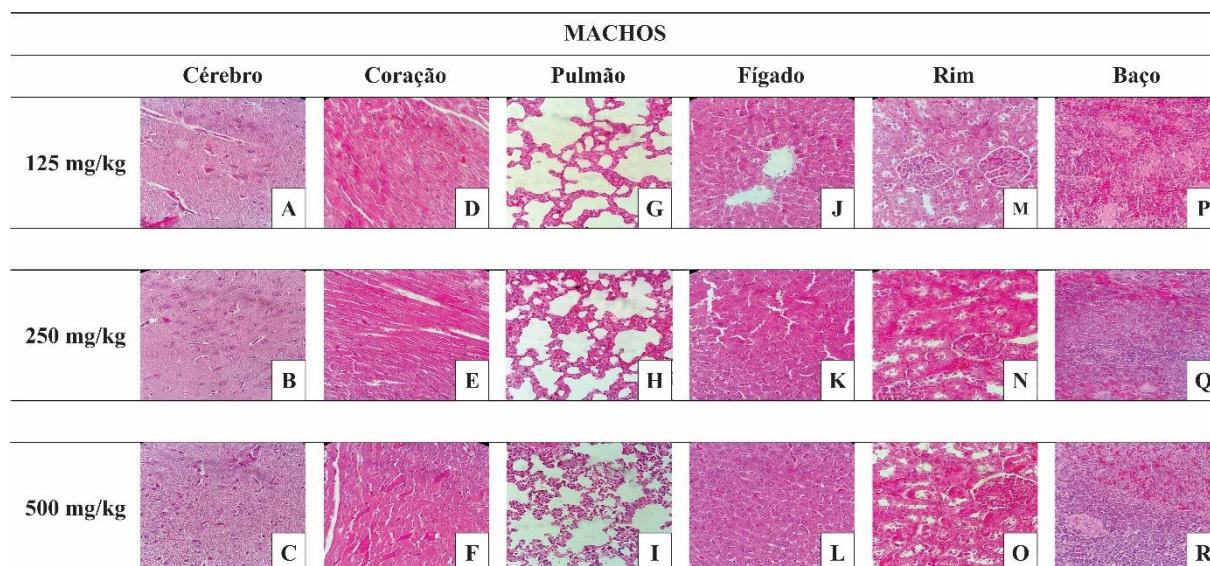
7.2. Material suplementar

Figura 1. Análise histopatológica dos órgãos das fêmeas tratadas com o extrato etanólico dos frutos da *C. pubescens* na toxicidade subcrônica (H & E: 20X e 40X).



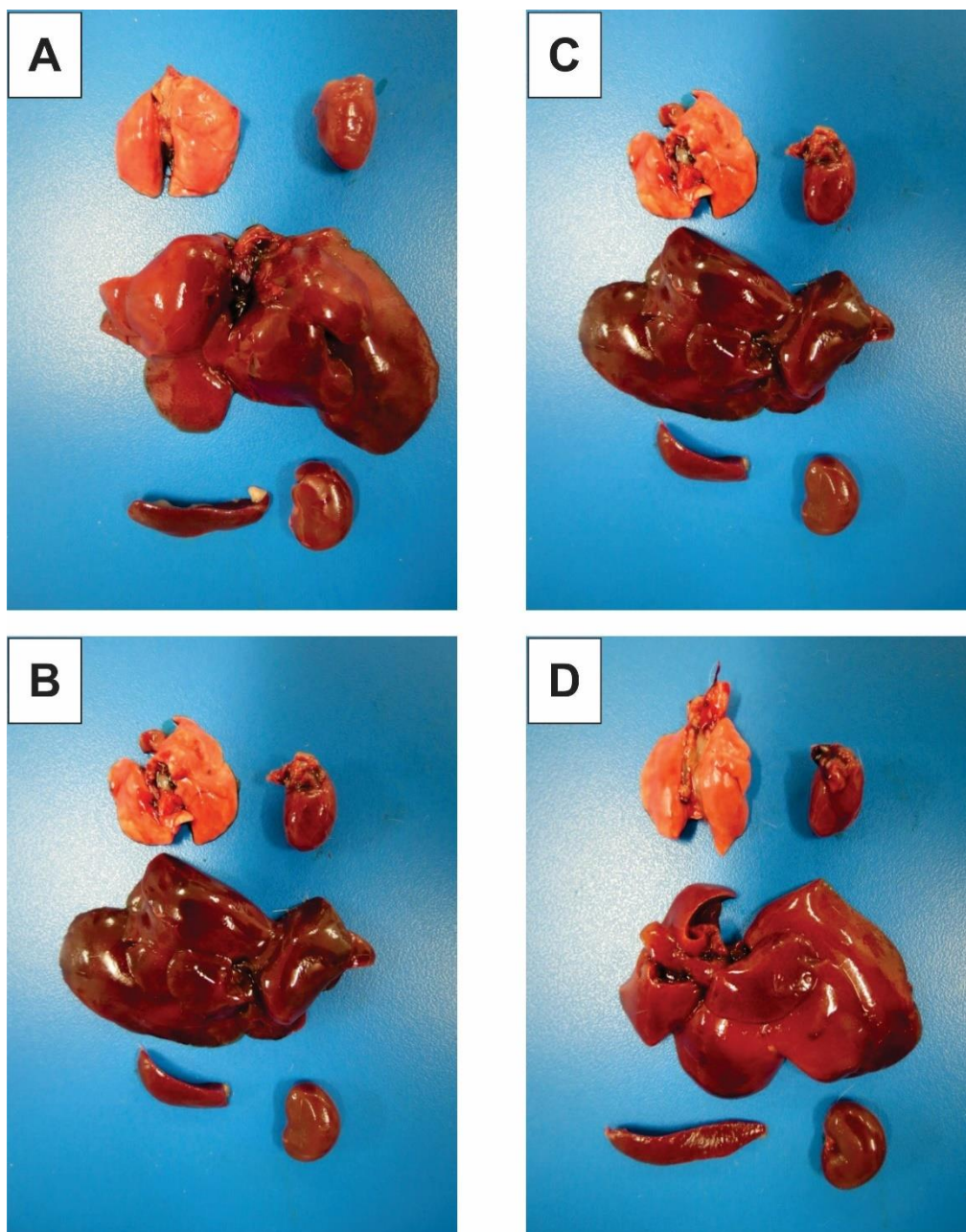
(A – C) cérebro; (D – F) coração; (H – J) pulmão; (K – M) fígado; (N – O) rim; (P – R) baço. FONTE: O autor.

Figura 2. Análise histopatológica dos órgãos dos machos tratados com o extrato etanólico dos frutos da *C. pubescens* na toxicidade subcrônica (H & E: 20X e 40X).



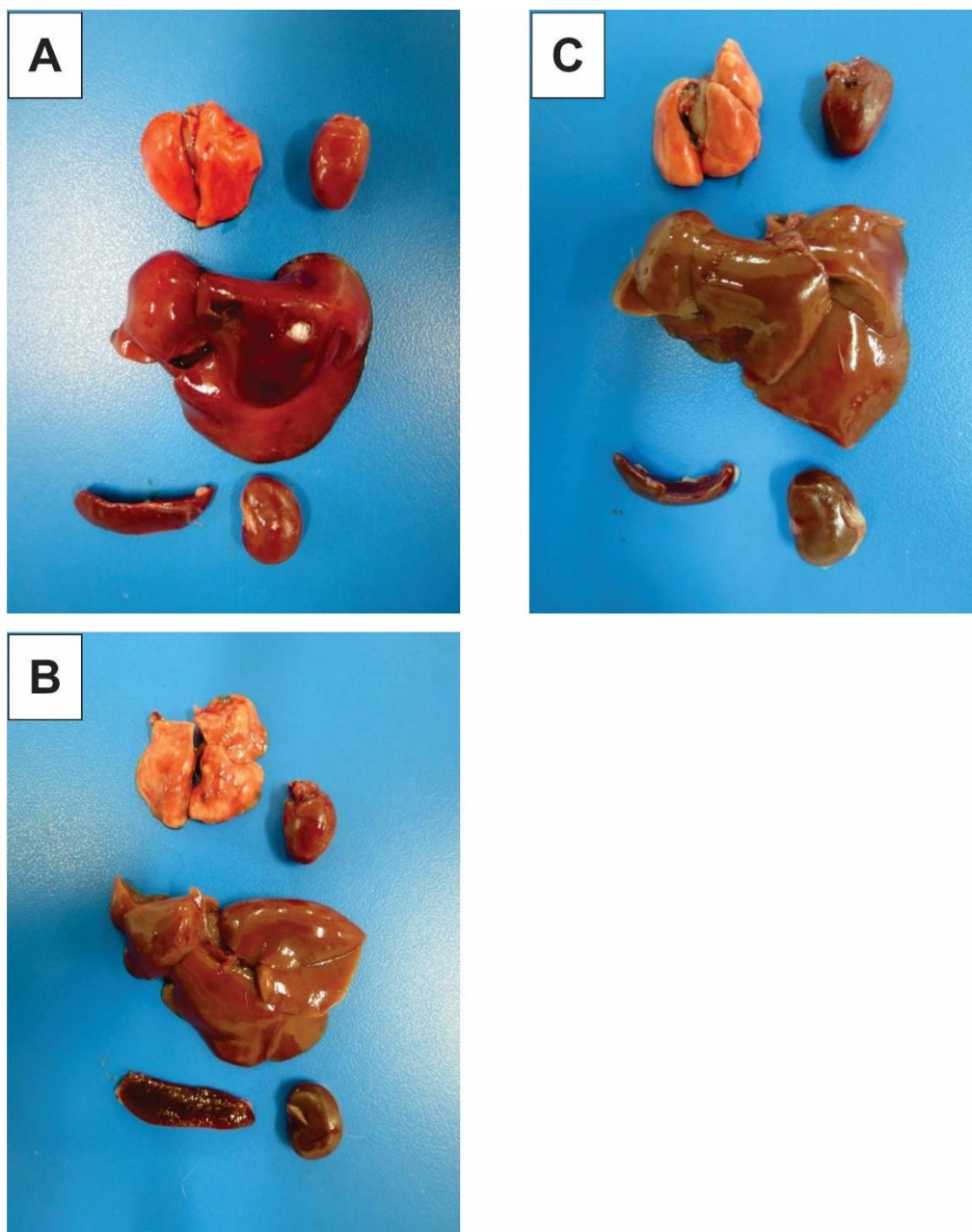
(A – C) cérebro; (D – F) coração; (H – J) pulmão; (K – M) fígado; (N – O) rim; (P – R) baço. FONTE: O autor.

Figura 3. Análise macroscópica de órgãos (pulmão, coração, fígado, baço e rim) das fêmeas tratadas com o extrato etanólico dos frutos da *C. pubescens* na toxicidade subcrônica.



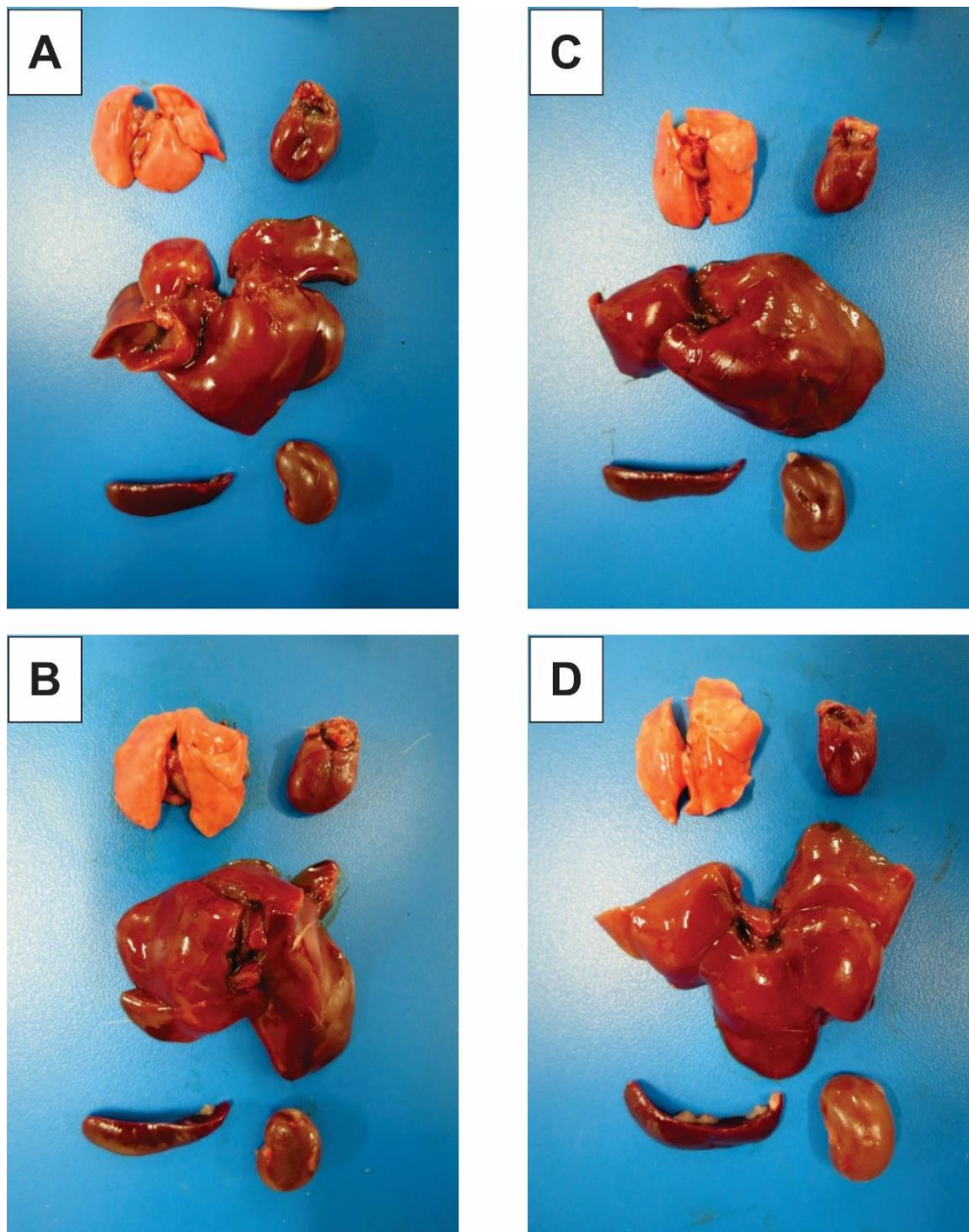
A: Animais tratados com 125 mg/kg; **B:** Animais tratados com 250 mg/kg; **C:** Animais tratados com 500 mg/kg; **D:** Animais tratados com 1000 mg/kg. FONTE: O autor.

Figura 4. Análise macroscópica de órgãos (pulmão, coração, fígado, baço e rim) das fêmeas tratadas com o extrato etanólico dos frutos da *C. pubescens* na toxicidade subcrônica.



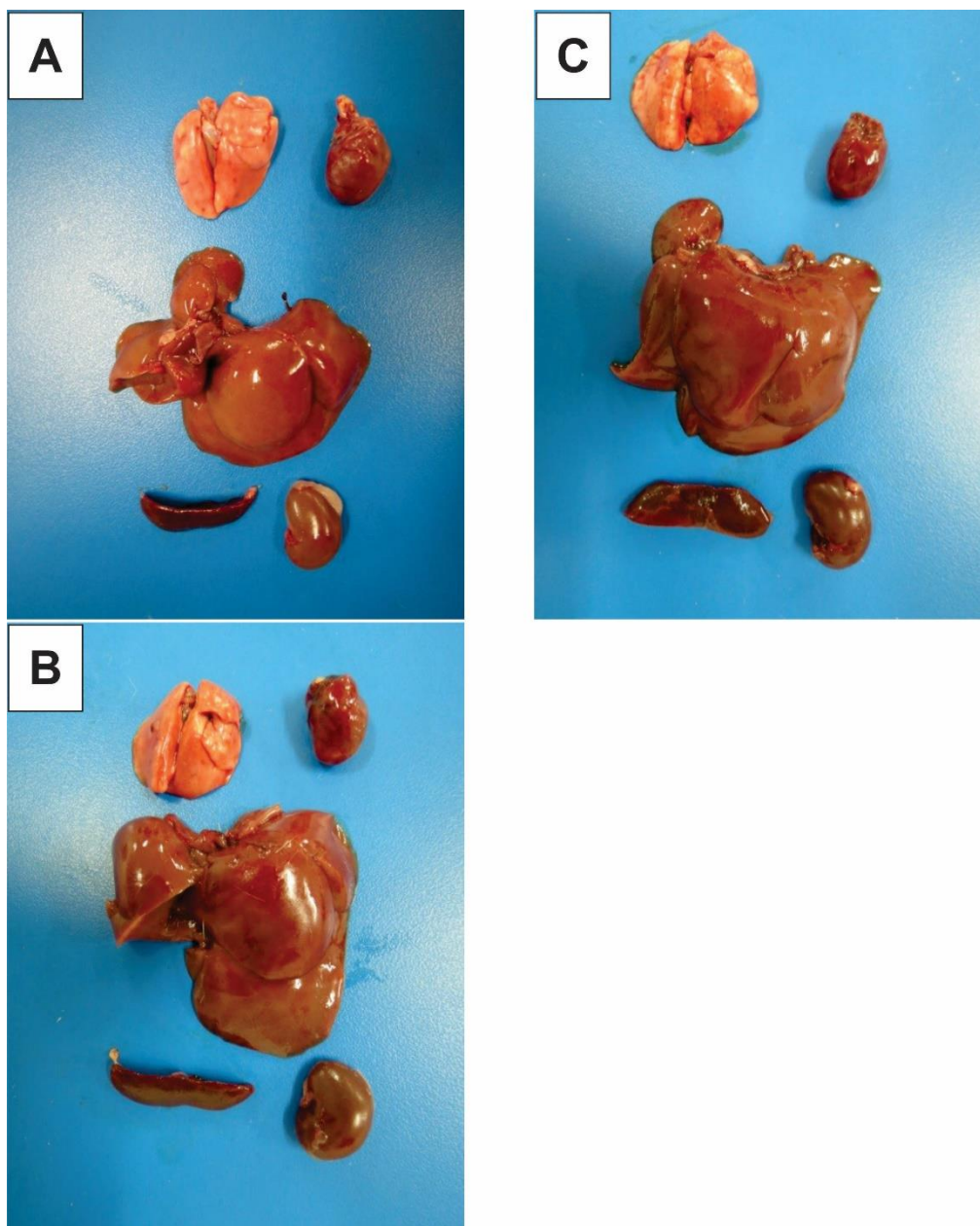
A: Animais tratados com solução fisiológica (grupo controle); **B:** Animais tratados com solução fisiológica (grupo controle satélite); **C:** Animais tratados com 1000 mg/kg (grupo satélite). FONTE: O autor.

Figura 5. Análise macroscópica de órgãos (pulmão, coração, fígado, baço e rim) dos machos tratados com o extrato etanólico dos frutos da *C. pubescens* na toxicidade subcrônica.



A: Animais tratados com 125 mg/kg; **B:** Animais tratados com 250 mg/kg; **C:** Animais tratados com 500 mg/kg; **D:** Animais tratados com 1000 mg/kg. FONTE: O autor.

Figura 6. Análise macroscópica de órgãos (pulmão, coração, fígado, baço e rim) dos machos tratados com o extrato etanólico dos frutos da *C. pubescens* na toxicidade subcrônica.



A: Animais tratados com solução fisiológica (grupo controle); **B:** Animais tratados com solução fisiológica (grupo controle satélite); **C:** Animais tratados com 1000 mg/kg (grupo satélite). FONTE: O autor.