

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**Investigação das atividades antidepressiva e adaptógena de *Ptychopetalum
olacoides* Bentham (Marapuama).**

Ângelo Luis Stapassoli Piato

Porto Alegre, 2009.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Investigação das atividades antidepressiva e adaptógena de *Ptychopetalum olacoides*
Bentham (Marapuama).

Tese apresentada por **Ângelo Luis Stapassoli Piato**
para a obtenção do TÍTULO DE DOUTOR
em Ciências Farmacêuticas

Orientadora: Prof^a Dra. Elaine Elisabetsky

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Doutorado da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 27.03.2009, pela Banca Examinadora constituída por:

Profa. Dra. Renata Pereira Limberger

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dra. Carla Dalmaz

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dra. Ana Lúcia Rodrigues

Universidade Federal de Santa Catarina

P582i Piato, Ângelo Luis Stapassoli
Investigação das atividades antidepressiva e adaptógena de *Ptychopetalum olacoides* Bentham (Marapuama) / Ângelo Luis Stapassoli Piato – Porto Alegre: UFRGS, 2009. – xvi, 96 p.: 1 il., 25 gráf., 2 tab.

Tese (doutorado). UFRGS. Faculdade de Farmácia. Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas.

1. Farmacologia. 2. *Ptychopetalum olacoides*: extrato etanólico. 3. Marapuama. 4. Atividade antidepressiva. 5. Estresse. I. Elisabetsky, Elaine. II. Título.

CDU: 547.9

Bibliotecária responsável:

Claudia da Silva Gonçalves de Leon – CRB10/1012

Este trabalho foi desenvolvido com a orientação da Prof^ª. Dra. Elaine Elisabetsky, no Laboratório de Etnofarmacologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. As dosagens de glicogênio, lactato e ácidos graxos de cadeia não-esterificada foram realizadas no Departamento de Bioquímica e as de creatina cinase e lactato desidrogenase na Faculdade de Veterinária da mesma Universidade. Parte da pesquisa e a bolsa do autor foram financiadas pelo CNPq.

AGRADECIMENTOS

- A DEUS, pelo dom da Vida e Vida em abundância.
- Aos meus pais e ao meu irmão.
- Às famílias Stapassoli e Grisa pelo apoio e carinho.
- À Daniela pelo apoio, compreensão, carinho e atenção.
- À Prof^a. Dra. Elaine Elisabetsky pela orientação científica e não-científica, ensinamentos, suporte financeiro e oportunidade de trabalhar em seu grupo de pesquisa.
- Ao Prof^o. Dr. Marcos Perry pela colaboração e auxílio.
- Às pessoas muito especiais e abençoadas que tornaram minha vida mais feliz: Viviane Linck, Lucas Rizzon, Bernardo Detanico, Jennifer Freitas e Ana Herrmann.
- À Ana Herrmann um agradecimento especial pelo carinho, apoio, incentivo e dedicação durante esse trabalho.
- Aos colegas do Laboratório de Etnofarmacologia.
- Aos meus grandes amigos Bernardo, Gustavo e Rafael Zan.
- Aos professores e funcionários do Departamento de Farmacologia/UFRGS.
- Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas/UFRGS.
- Ao CNPq pela bolsa de estudo.
- Aos funcionários do camundongário, Jorge e Rose.
- A todos que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE ABREVIATURAS	xi
RESUMO	xiii
ABSTRACT	xiv
APRESENTAÇÃO	xvii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Estresse	1
1.2. Depressão	3
1.2.1. Prevalência	5
1.2.2. Bases Neurobiológicas	6
1.2.3. Antidepressivos	11
1.3. Adaptógenos	14
1.4. <i>P. olacoides</i> : etnofarmacologia e perfil psicofarmacológico	16
2. OBJETIVOS	21
2.1. Objetivos Gerais	21
2.2. Objetivos Específicos	21
3. ARTIGOS CIENTÍFICOS	23
3.1. Antidepressant profile of <i>Ptychopetalum olacoides</i> Bentham (Marapuama) in mice.	24
3.2. Effects of Marapuama in the chronic mild stress model: further indication of antidepressant properties.	31
3.3. Anti-Stress Effects of the “Tonic” Marapuama in Mice.	37
3.4. <i>Ptychopetalum olacoides</i> (Marapuama) improves physical endurance in mice.	56

4. DISCUSSÃO	75
5. CONCLUSÃO	81
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	83
7. ANEXO - Carta de aprovação do comitê de ética	95

LISTA DE FIGURAS

	Página
Introdução	
Figura 1 – <i>Ptychopetalum olacoides</i> Bentham (Olacaceae).	16
Artigos Científicos	
Artigo 3.1	
Table 1: The effects of saline and antagonists on locomotion.	27
Table 2: Effects of imipramine and POEE in tail suspension and forced swimming tests.	27
Figure 1. Effects of AMPT and PCPA on POEE actions in the TST.	27
Figure 2. Effects of SCH 23390, sulpiride, and propranolol on the actions of POEE and imipramine in the FST.	28
Figure 3. Effects of SCH 23390 and propranolol on the actions of POEE and imipramine in the TST.	28
Artigo 3.2	
Fig.1. Effects of EEPO and imipramine on the coat state of mice during and at the end of 6 weeks of UCMS.	34
Fig.2. Effects of POEE and imipramine in the splash test.	35
Fig.3. Effects of POEE and imipramine on corticosterone levels of mice submitted to UCMS.	35
Artigo 3.3	
Fig.1. Effects of POEE, imipramine and diazepam on the light/dark test.	53
Fig.2. Effects of POEE and imipramine on glycemia.	54
Fig.3. Effects of POEE on mice endurance to hypoxia.	55
Artigo 3.4	
Fig.1. Effects of POEE and PQ on swimming endurance.	70
Fig.2. Effects of POEE and PQ on liver and muscle glycogen and glycemia	71

in non-exercised and exercised mice.

Fig.3. Effects of POEE and PQ on serum lactate and NEFA levels in non-exercised and exercised mice. 72

Fig.4. Effects of POEE and PQ on serum CK and LDH levels in non-exercised and exercised mice. 73

LISTA DE ABREVIATURAS

ACTH	hormônio adrenocorticotrópico
AMPC	adenosina monofosfato cíclico
ANOVA	análise de variância
BDNF	<i>Brain-derived neurotrophic factor</i>
CID-10	código internacional de doenças
CK	creatina cinase
CRH	hormônio liberador de corticotropina
DA	dopamina
DSM-IV	Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais 4º edição
EEPO	extrato etanólico de <i>Ptychopetalum olacoides</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FST	teste de nado forçado
GABA	ácido gama-amino butírico
GR	receptor glicocorticóide
5HT	serotonina
5HIAA	ácido 5-hidroxiindolacético
HVA	ácido homovanílico
HPA	hipotálamo-pituitária-adrenal
IL	interleucina
IMAO	inibidor da monoaminoxidase
i.p.	intraperitoneal
ISRS	inibidor seletivo da recaptação de serotonina
LDH	lactato desidrogenase
MAO	monoaminoxidase

MHPG	3-metoxi-4-hidroxi-fenilglicol
MK801	dizocilpina
MR	receptor mineralocorticóide
NEFA	ácidos graxos não-esterificados
NK	<i>natural killer</i>
NMDA	N-metil-D-aspartato
NO	óxido nítrico
PO	<i>Ptychopetalum olacoides</i>
PQ	<i>Panax quinquefolium</i>
PVN	núcleo paraventricular
SGA	síndrome geral de adaptação
SNC	sistema nervoso central
TCA	antidepressivos tricíclicos
TST	teste de suspensão pela cauda
UCMS	estresse crônico moderado imprevisível
v.o.	via oral

RESUMO

EEPO é um extrato etanólico padronizado de *Ptychopetalum olacoides* Bentham (Olacaceae), planta medicinal nativa usada na região da Amazônia conhecida como Marapuama. O uso tradicional e popular de Marapuama sugere utilidade em desordens depressivas e também no manejo do estresse. Mostramos que EEPO apresenta efeito tipo antidepressivo nos modelos de nado forçado e suspensão pela cauda. Através do uso de inibidores de síntese e antagonistas específicos, verificou-se que este efeito tipo antidepressivo envolve receptores β -adrenérgico e D₁-dopaminérgico, mas independe do sistema serotoninérgico. No modelo de estresse crônico moderado imprevisível, que apresenta além de boa preditibilidade excelente valor de face e de homologia, de maneira semelhante à imipramina EEPO preveniu a degradação do pêlo, a diminuição no número de *groomings* e o aumento nos níveis de corticosterona. Esses resultados demonstram que EEPO possui atividade tipo antidepressiva em modelos consolidados de identificação e caracterização de drogas antidepressivas. Mostramos também que EEPO apresenta perfil semelhante a drogas adaptógenas, já que preveniu os efeitos ansiogênicos (avaliado pelo teste de claro-escuro) e hiperglicemiante induzidos pelo protocolo de estresse crônico moderado imprevisível, assim como a resistência à hipóxia e à fadiga por exercício (nado com carga à exaustão). A resistência à convulsão induzida por hipóxia pode, pelo menos em parte, ser explicada pela ação do extrato em receptores noradrenérgicos e por sua atividade antioxidante. O efeito antifadiga de EEPO parece ser a consequência de um metabolismo energético mais eficiente (poupando glicogênio, estimulando a lipólise e diminuindo a produção de lactato) associado à proteção do músculo ao dano causado pelo exercício (prevenindo o aumento dos níveis séricos de creatina cinase e lactato desidrogenase). Este trabalho traz subsídios científicos que parecem legitimar os usos tradicionais de Marapuama e algumas das alegações do mercado fitoterápico. Esta tese reforça a idéia de que a sócio-biodiversidade brasileira pode ser base para a inovação tecnológica na área de fármacos.

Palavras-chaves: *Ptychopetalum olacoides*, Marapuama, depressão, estresse, fadiga.

ABSTRACT

Investigation of the antidepressant and adaptogen activities of *Ptychopetalum olacoides* Bentham (Marapuama)

POEE is a standardized ethanol extract of *Ptychopetalum olacoides* Bentham (Olacaceae), a native medicinal plant used in Amazon region and known as Marapuama. The traditional uses of Marapuama suggest that the species may possess properties useful for treating depressive disorders and coping with stress. We showed that POEE presents antidepressant-like effects in the forced swimming and tail suspension tests. Using synthesis inhibitors and specific antagonists, we verified that such antidepressant-like effect involves β -adrenergic and D_1 -dopaminergic receptors, and is not dependent on serotonergic system. In the unpredictable chronic mild stress model, which not only presents good predictability value but also excellent face and construct validities, likewise imipramine, POEE prevented the UCMS-induced coat degradation, the decrease in groomings and the increase in corticosterone levels. These results demonstrate that POEE possesses antidepressant-like activity in animal models recognized as appropriate to identify and characterize antidepressant drugs. We have also showed that POEE presents a profile similar to adaptogens, given that it prevented the anxiogenic effects (assessed by the light-dark test) and hyperglycemia induced by the unpredictable chronic mild stress protocol, and increased the resistance to hypoxia and to exercise-induced fatigue (swimming until exhaustion carrying loads). The POEE-induced resistance to hypoxia may be, at least in part, explained by the extract modulation on noradrenergic receptors and its antioxidant activity. The antifatigue effects of POEE seem to be consequence of a more efficient energy utilization (by sparing glycogen, stimulating lipolysis and reducing lactate production) associated with protecting the muscle against exercise-induced damage (by preventing the increase in serum levels of creatine kinase and lactate dehydrogenase). This study provides scientific basis that seems to legitimize some traditional uses and allegations by the herbal market for Marapuama medicinal properties. This study reinforces the idea that the socio-biodiversity available in Brazil can serve as basis for innovation in pharmaceuticals.

Key-words: *Ptychopetalum olacoides*, Marapuama, depression, stress, fatigue.

APRESENTAÇÃO

Conforme resolução Nº 093/2007 da Câmara de Pós-Graduação desta Universidade, essa tese é constituída por Introdução, Objetivos, Artigos Científicos submetidos ou a serem submetidos, Discussão, Conclusões e Referências Bibliográficas. O item **1. Introdução:** oferece o embasamento teórico necessário para a formulação dos objetivos e para o desenvolvimento da metodologia empregada nesta dissertação. O item **2. Objetivos:** define a hipótese de trabalho e as estratégias metodológicas utilizadas. No item **3. Artigos Científicos:** são encontrados os artigos científicos (material e método, resultados e discussão dos resultados encontram-se nos próprios artigos e representam a íntegra deste estudo). O item **4. Discussão:** contém interpretações e comentários gerais pertinentes aos resultados apresentados no item 3, e aponta perspectivas para continuidade do trabalho. O item **5. Conclusões:** apresenta as conclusões gerais. O item **6. Referências Bibliográficas** refere-se somente às citações que aparecem na introdução e discussão (referências bibliográficas que se referem a materiais e métodos, resultados e discussão parcial encontram-se nos artigos do item 3).

1. INTRODUÇÃO

1.1. Estresse

Atualmente é bem aceita a idéia de que o estresse pode estar envolvido na etiologia de inúmeras doenças, incluindo desordens psiquiátricas (depressão, ansiedade, psicoses), disfunções cognitivas (lapsos de memória), imunológicas (imunossupressão), endócrinas (como diabete), sexuais (impotência), úlcera péptica e hipertensão (TSIGOS e CHROUSOS, 2002). Já Selye (1936) demonstrou que um organismo exposto a um esforço desencadeado por um estímulo ameaçador à homeostase, seja ele físico, químico, biológico ou mesmo psicossocial, apresenta uma tendência de responder de forma uniforme, inespecífica, anatômica e fisiológica. “Síndrome geral de adaptação” (SGA) foi a denominação dada por Selye a esse conjunto de reações inespecíficas da qual o organismo participa como um todo e que consistiria em três fases: reação de alarme, fase de resistência e fase de exaustão. Já à época se enfatizou que não é necessário que a fase se desenvolva até o final para que haja o estresse, e é evidente que só nas situações de estresse mais intenso atinge-se a fase de exaustão. Na fase de alarme, a resposta do organismo é de luta ou fuga. São característicos o aumento da frequência cardíaca e da pressão arterial (para permitir que o sangue circule mais rapidamente e, portanto, para chegar aos músculos esqueléticos e cérebro mais oxigênio e nutrientes para facilitar a mobilidade e o movimento), a contração do baço (levando mais glóbulos vermelhos à corrente sanguínea, facilitando a oxigenação), a glicogenólise no fígado (provendo energia para os músculos e cérebro), a redistribuição sanguínea (diminuindo o fluxo para a pele e vísceras, aumentando para músculos e cérebro), a dilatação dos brônquios (para que o organismo possa captar mais oxigênio), a dilatação pupilar e exoftalmia (para aumentar a eficiência visual) e o aumento do número de linfócitos na corrente sanguínea (para reparar possíveis danos aos tecidos eventualmente causados por agentes agressores). Tais reações são desencadeadas por descargas adrenérgicas da medula da glândula supra-renal e de noradrenalina em fibras pós-ganglionares do sistema nervoso autônomo simpático. Ao mesmo tempo, ocorre ativação do eixo

hipotálamo-pituitária-adrenal (eixo HPA) que desencadeia respostas mais lentas e prolongadas, desempenhando um papel crucial na adaptação do organismo ao estresse. Neurônios do núcleo paraventricular (PVN) do hipotálamo secretam o hormônio liberador de corticotropina (CRH), que por sua vez estimula a síntese e liberação do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) da pituitária anterior, além de outros neuro-hormônios e peptídeos cerebrais, como beta-endorfinas e prolactina. O ACTH desencadeia a síntese e a secreção de glicocorticóides (cortisol em humanos e corticosterona em roedores) pelo córtex da supra-renal. Esses glicocorticóides podem atuar em dois tipos de receptores, os mineralocorticóides (MR) e os glicocorticóides (GR), em diferentes regiões cerebrais (CARRASCO e VAN DE KAR, 2003). Estabelece-se então um mecanismo de retroalimentação negativa com os glicocorticóides atuando sobre o eixo HPA. Se os agentes estressantes desaparecerem, tais reações tendem a regredir; entretanto, se o organismo é obrigado a manter seu esforço de adaptação, inicia-se uma nova fase, que é chamada fase de resistência. Essa fase se caracteriza pela reação de hiperatividade do eixo HPA, com aumento do volume do córtex da supra-renal, atrofia do baço e de estruturas linfáticas, leucocitose, diminuição de eosinófilos e ulcerações. Mantida a situação, poderá ainda haver falência dos mecanismos de defesa, dando início à terceira fase, que é a de exaustão. Em condições de exaustão há dificuldades na manutenção dos mecanismos adaptativos e perda de reserva energética, podendo levar à morte do organismo. Assim, ainda que as reações ao estresse resultem de esforços de adaptação, se a reação ao agressor for muito intensa ou se o agente estressor for muito potente e/ou prolongado, o estresse pode ter como conseqüência doenças ou uma maior predisposição ao desenvolvimento de doenças (CHARNEY, 2004; McEWEN, 2005).

Mais recentemente, McEwen (2003) reinterpretou as idéias de Selye, propondo o conceito de alostase. A alostase se refere a um processo ativo e adaptativo pelo qual o organismo responde aos eventos estressores diários e mantém a homeostase (alostase literalmente significa alcançar a estabilidade através da mudança) (STERLING e EYER, 1988). Na alostase ocorre liberação de catecolaminas e glicocorticóides em resposta às ameaças (interação social, clima, doenças, predadores, poluição) (McEWEN, 2003), e ao conjunto do efeito cumulativo destas respostas se denomina

“carga alostática” (McEWEN, 2008). Entretanto, se a carga alostática for mantida, com elevada ativação do eixo HPA e liberação de catecolaminas, pode-se gerar uma sobrecarga alostática que seria equivalente à fase de exaustão proposta por Selye (JOCA *et al.*, 2007). Tanto a carga alostática como a sobrecarga alostática equivalem a um gerenciamento inadequado da alostase, resultado de efeitos cumulativos das demandas do ambiente que requerem efeito adaptativo (MCEWEN, 2008). Como implicação maior desta proposta, seria a sobrecarga alostática o fator que predispõe o indivíduo à doença. Um exemplo descrito por McEwen (2007) é a diferença entre ursos criados em cativeiro e ursos livres em seu habitat natural: quando inicia o inverno ursos em seu habitat natural consomem grandes quantidades de alimentos e gorduras para utilizarem como fonte de energia durante a rígida estação; já os animais criados em cativeiro, sem atividade e entediados, apresentam acúmulo de gorduras que pode desencadear quadros patológicos e, nesse caso, estamos falando de sobrecarga alostática.

Ainda que há muito se tenha notado o papel do evento estressante como desencadeador de episódios de depressão, reconhece-se hoje que a hiperativação sustentada do eixo HPA está relacionada com a fisiopatologia da depressão (BISSETE *et al.*, 2003; GILLESPIE e NEMEROFF, 2005; McEWEN, 2005). Pacientes deprimidos apresentam alterações na secreção de cortisol (em mais de 80% dos pacientes) (THOMSON e CRAIGHEAD, 2008), hiperplasia do córtex da supra-renal, níveis elevados de CRH no líquido e resposta embotada ao teste com a dexametasona (BARDEN, 2004). Já que relação entre estresse e depressão é consistente, a busca por agentes que sejam capazes de modular o eixo HPA pode ser uma importante alternativa para o tratamento dessa patologia.

1.2. Depressão

A depressão é um problema médico grave e altamente prevalente na população mundial. Está associada a altos custos sociais e financeiros pela perda de produtividade, em função de maior frequência de faltas ao trabalho e pela redução de eficiência profissional. O Manual Estatístico Diagnóstico da Associação Norte-

Americana de Psiquiatria, na sua quarta versão (DSM-IV) define a depressão como um transtorno heterogêneo, que freqüentemente se manifesta com sintomas psicológicos, comportamentais e fisiológicos. A depressão é um transtorno multifacetado, em que uma variedade de sintomas pode estar presente, mas nenhum deles, incluindo humor deprimido, é essencial (AKISKAL, 2005). A depressão é freqüentemente associada a comorbidades incluindo o abuso de álcool e substâncias e transtornos de ansiedade, o que pode piorar a resposta ao tratamento e a evolução do quadro.

Os distúrbios depressivos incluem a depressão maior, a distímia e tipos não-especificados de depressão. A depressão maior caracteriza-se por depressão clinicamente significativa de humor e comprometimento da funcionalidade como manifestações clínicas primárias (BALDESSARINI, 2006). Caracteriza-se por um ou mais episódios depressivos, com pelo menos duas semanas de humor deprimido ou perda de interesse na maior parte das atividades, acompanhados de pelo menos quatro sintomas adicionais de depressão, que incluem sentimento de desesperança, desvalia, culpa, desamparo, associados a alterações de apetite e sono, fadiga, retardo ou agitação psicomotora, diminuição do desempenho sexual, dificuldade de concentração e raciocínio e pensamentos recorrentes sobre a morte, com ou sem tentativas de suicídio (DSM-IV). Os episódios depressivos maiores são freqüentemente autolimitados, com duração de seis meses ou mais, embora em alguns pacientes (20-30%) determinados sintomas possam persistir.

Um subtipo de depressão que merece consideração especial por sua elevada incidência na população é a depressão melancólica (antes chamada de endógena), responsável por 40-60% de todas as internações por distúrbios afetivos. É diagnosticada em pacientes que se enquadram no diagnóstico de depressão maior, apresentando cinco das seguintes características: perda de interesse na maior parte das atividades, ausência de reação a estímulos normalmente prazerosos, piora matinal, agitação ou retardo psicomotor, anorexia ou perda de peso acentuado, sem distúrbio de personalidade antes do primeiro episódio de depressão, um ou mais episódios prévios de depressão seguidos de recuperação completa ou quase completa e boa resposta prévia ao tratamento (WANNMACHER, 2004).

A distímia é um distúrbio depressivo crônico, menos grave que a depressão. É caracterizada por pelo menos dois anos de humor deprimido na maior parte dos dias, acompanhados de sintomas depressivos que não chegam a caracterizar um episódio depressivo maior. Sua prevalência durante toda vida é de aproximadamente de 6% (BALDESSARINI, 2006).

Os distúrbios depressivos não-especificados incluem quadros depressivos que não preenchem os critérios para depressão maior ou distímia, nem para os distúrbios de adaptação com humor deprimido ou com sintomas mistos de ansiedade e depressão (BALDESSARINI, 2006).

1.2.1. Prevalência

Nas últimas três décadas, estudos epidemiológicos têm demonstrado consideráveis variações na prevalência da depressão. Tal variabilidade pode ser explicada pelo uso de diferentes metodologias empregadas nos estudos como, por exemplo, amostragem da população em risco, sistema de diagnóstico empregado, método para obtenção das informações sobre os sintomas e o tempo em que a informação foi obtida (WEISSMAN *et al.*, 1992). Estudos na Europa e Japão mostraram taxas de prevalência de 1,4% a 53,4% em determinadas populações respectivamente (FICHTER *et al.*, 1996; TOMODA *et al.*, 2000). Nos Estados Unidos a prevalência é de 21,3% em mulheres e 12,7% em homens (BLAZER *et al.*, 1994). No Brasil, em estudo realizado por Goldbert e Lecrubier (1995), a taxa foi estimada em 15,8%.

Apesar da variabilidade dos estudos, há um consenso de que a prevalência da depressão é consistentemente alta ao redor do mundo, associada com elevadas taxas de morbidade e mortalidade. Trata-se de doença crônica, recorrente e potencialmente fatal que afeta 20% da população global (NESTLER *et al.*, 2002). A doença é mais prevalente em mulheres, com uma razão de cinco mulheres para dois homens.

Além de ser uma doença incapacitante, a depressão gera custos enormes para os governos e sociedade. Estima-se que os gastos diretos e indiretos com a depressão nos EUA sejam em torno de US\$ 43 bilhões por ano (MURRAY e LOPEZ, 1996). Outro

importante fator é a elevada taxa de suicídio em consequência da depressão. Suicídio é a oitava maior causa de morte nos EUA. Essa taxa é ainda mais preocupante quando é analisada em função da idade, sendo a sexta maior causa de morte na faixa de 5-14 anos, a terceira maior causa de morte na faixa de 15-24 anos e a quarta maior causa de morte na faixa de 25-44 anos (MURPHY, 2000).

1.2.2. Bases Neurobiológicas

Apesar da alta prevalência da depressão e seu considerável impacto na nossa sociedade, o conhecimento sobre as bases neurobiológicas da doença é ainda incipiente se comparada com outras doenças crônicas e potencialmente fatais como, por exemplo, a *diabetes* do tipo 2. Além disso, a síndrome depressiva chamada de depressão maior (conforme o DSM-IV), ou episódio depressivo (de acordo com o CID-10), representa um grupo heterogêneo de pacientes e isso, de certa forma, poderia dificultar o progresso da pesquisa da neurobiologia da depressão. Entre as tentativas para explicar os processos neurobiológicos envolvidos na depressão surgiram algumas teorias.

A teoria monoaminérgica da depressão proposta por Schildkraut e col. (1965) propõe que a doença é causada por um déficit funcional de neurotransmissores (especialmente noradrenalina) em certas regiões cerebrais. Esta hipótese foi originalmente proposta a partir de associações entre os efeitos clínicos de algumas drogas que causavam ou aliviavam os sintomas de depressão e seus efeitos neuroquímicos conhecidos sobre a transmissão monoaminérgica no cérebro. Entre essas drogas estão, por exemplo, a iproniazida (utilizada inicialmente para tratamento da tuberculose) e a imipramina (utilizada inicialmente como antipsicótico, pois é estruturalmente semelhante à clorpromazina), que têm potente atividade antidepressiva em humanos, para as quais foi posteriormente demonstrada a capacidade de aumentar a transmissão noradrenérgica e serotonérgica central. Como uma boa contraprova da hipótese, sabia-se que a reserpina, um antigo anti-hipertensivo capaz de depletar estoques de monoaminas, induz sintomas depressivos. Algumas observações experimentais também apoiaram essa hipótese. Uma sub-população de deprimidos

apresentava diminuição dos níveis urinários de 3-metoxi-4-hidroxi-fenilglicol (MHPG), um metabólito da noradrenalina relacionado com a taxa de renovação de noradrenalina cerebral. Outras evidências também corroboram o que ficou conhecida como a teoria monoaminérgica da depressão; entretanto, esta teoria não explica a necessidade de períodos razoavelmente longos de tratamento para o início do efeito clínico dos antidepressivos.

O sistema noradrenérgico apresenta quase todos os corpos celulares dos seus neurônios localizados no *locus ceruleus*; tais neurônios são projetados para várias regiões como hipotálamo, gânglios da base, sistema límbico e córtex. Essa distribuição difusa dos neurônios noradrenérgicos está relacionada com sua atividade modulatória sobre outros sistemas. Projeções noradrenérgicas na amígdala e hipocampo estão implicadas na memória emocional, e a sensibilização continuada do *locus ceruleus* contribui para o estado de desamparo aprendido, considerado um correlato animal de estado depressivo em humanos (THASE, 2005). O *locus ceruleus* tem sua atividade aumentada quando ocorre percepção a um novo estímulo, e tem sua atividade diminuída durante a alimentação e o sono. Além disso, neurônios dessa região fazem retroalimentação positiva sobre o CRH no hipotálamo e regiões corticais; outros exercem retroalimentação negativa para evitar excesso de ativação, como por exemplo, a inibição da liberação de serotonina por ativação de receptores α -2-adrenérgicos. Outras alterações relacionadas ao sistema noradrenérgico em pacientes deprimidos são aumento de receptores β -adrenérgicos em cérebro *post-mortem* de suicidas e diminuição da expressão desses mesmos receptores após tratamento com antidepressivos.

Na década de 70, a hipótese serotoninérgica afirmou que na depressão há uma diminuição importante da função serotoninérgica. Asberg e col. (1976) associaram baixas concentrações líquóricas do metabólito de serotonina 5-HIAA com comportamento suicida. Além disso, precursores de serotonina, como o l-triptofano e o 5-hidróxi-triptofano, apresentam moderada ação antidepressiva. Neurônios serotoninérgicos do núcleo dorsal da rafe projetam-se para o córtex, hipotálamo, tálamo, gânglios da base, *septum* e hipocampo, tanto com transmissões inibitórias quanto excitatórias. Evidências sugerem que a serotonina esteja envolvida com o sono, o

apetite, a temperatura corporal, o metabolismo e a libido, que estão freqüentemente alterados em pacientes deprimidos. Como evidência adicional da ligação do estresse com a depressão, sabe-se que, enquanto o estresse agudo aumenta a liberação de serotonina, o estresse crônico causa diminuição e depleção deste neurotransmissor. O estresse crônico também pode aumentar a síntese de auto-receptores no núcleo dorsal da rafe, diminuindo a transmissão serotoninérgica (THASE, 2005).

Apesar da hipótese monoaminérgica da depressão ser relativamente simplista, a manipulação farmacológica da transmissão monoaminérgica continua sendo a abordagem terapêutica mais bem-sucedida. Além da noradrenalina e da serotonina, outros neurotransmissores como a acetilcolina, a dopamina, o glutamato, o fator liberador de corticotropina (CRH), e mesmo fatores de crescimento como o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) têm sido implicados na etiologia da depressão.

Janovsky e col. (1972) propuseram que aumentos nos níveis de acetilcolina estariam associados à depressão. Tal proposta baseou-se no fato de que a fisostigmina, uma droga anticolinesterásica, pode induzir sintomas depressivos (MCKINNEY, 1984). Entretanto, essa hipótese colinérgica da depressão apresenta limitações como a falta de comprovação da eficácia antidepressiva de anticolinérgicos (THASE, 2005).

Evidências clínicas de manipulações farmacológicas e resultados de modelos animais sugerem que a neurotransmissão dopaminérgica está diminuída na depressão (WILLNER *et al.*, 2005). Entre as evidências que corroboram essa afirmação, está a diminuição dos níveis de ácido homovanílico (HVA, metabólito da dopamina) no líquor de pacientes deprimidos. Além disso, alguns sintomas que podem estar presentes na depressão como anedonia, isolamento social, desinteresse e retardo psicomotor parecem estar relacionados com áreas dopaminérgicas do sistema nervoso central (SNC). O sistema dopaminérgico apresenta quatro projeções neurais principais. A via túbero-infundibular projeta seus neurônios do hipotálamo à pituitária, estando relacionada com o controle inibitório da secreção de prolactina. A via nigro-estriatal origina-se na substância *nigra* e envia seus axônios aos gânglios da base, regulando a atividade motora involuntária. Os corpos celulares da via mesolímbica estão localizados na área tegmental ventral e projetam-se para o núcleo *accumbens*,

hipocampo, núcleo dorsal medial do tálamo e giro cingulado; essa via está relacionada com a expressão emocional, aprendizado e capacidade de sentir prazer. A via mesocortical também se origina da área tegmental ventral e projeta-se para o córtex pré-frontal e orbitofrontal; essa via está relacionada com a motivação, concentração e tarefas executivas complexas. A diminuição da atividade nessas duas últimas vias dopaminérgicas está relacionada com os distúrbios motores, cognitivos e hedônicos associados à depressão (THASE, 2005).

Há evidências de que o ácido gama-aminobutírico (GABA) e o glutamato, além de peptídeos como a substância P, também estão envolvidos na depressão. O GABA é o principal neurotransmissor inibitório do SNC; pacientes deprimidos apresentam redução da atividade gabaérgica no plasma, líquido cefalorraquidiano e encéfalo (FLORES *et al.*, 2004). Agonistas desse receptor aumentam produção de AMPc durante exposição a outros neurotransmissores como a noradrenalina. Por exemplo, a administração de baclofen (agonista GABA_B) com imipramina causa invaginação de receptores adrenérgicos mais rapidamente do que se as drogas fossem administradas separadamente (ENNA *et al.*, 1986). Assim, é possível que a neurotransmissão mediada pelo GABA desempenhe papel na depressão e/ou no efeito de tratamentos antidepressivos. O aminoácido glutamato é o mais importante neurotransmissor excitatório do SNC e excessos de glutamato possuem efeitos neurotóxicos. O sistema glutamatérgico parece estar hiperativado na depressão, com níveis aumentados de glutamato e de seu metabólito glutamina encontrados em pacientes deprimidos (MITATI *et al.*, 2006; SANACORA *et al.*, 2008). Antagonistas de glutamato já demonstraram ter efeito tipo antidepressivo em vários modelos animais (MELONI *et al.*, 1993; PAPP e MORYL, 1994; LAYER *et al.*, 1995). Estudos recentes também demonstraram atividade antidepressiva de cetamina (antagonista NMDA) em humanos (ZARATE *et al.*, 2006). Pacientes que receberam cetamina mostraram uma melhora significativa no humor em apenas 110 minutos após a injeção e esse efeito permaneceu durante uma semana.

A substância P é um neuropeptídeo, pertencente à família das neurocininas, e exerce sua ação através de receptores NK, presentes na amígdala, no hipotálamo e no hipocampo (STOUT *et al.*, 2001). Estudos demonstram que a substância P aumenta o

disparo de neurônios no *locus ceruleus*, além de possuir um papel central na resposta ao estresse. Antagonistas da substância P podem ter efeito antidepressivo em ratos (MALKESMAN *et al.*, 2007).

A hipótese neurotrófica da depressão foi baseada em estudos em roedores que, após exposição a estresse agudo ou crônico, apresentaram diminuição dos níveis de BDNF no hipocampo, além do fato de que o tratamento com diversos antidepressivos tanto preveniram a ação do estresse quanto reverteram a diminuição de BDNF (DUMAN, 2004). Além disso, autópsias realizadas em pacientes deprimidos mostraram que os níveis de BDNF estão reduzidos no hipocampo, alteração ausente em pacientes tratados com antidepressivos (CHEN *et al.*, 2001). Apesar dos resultados da associação entre BDNF e depressão não estarem totalmente esclarecidos, uma possibilidade é que essa diminuição nos níveis de BDNF estaria relacionada com o dano estrutural e a redução da neurogênese hipocampal após o estresse (BERTON e NESTLER, 2006).

Outra teoria que também tenta explicar a fisiopatologia da depressão é a teoria citocinérgica, que associa alterações imunológicas com a depressão. As citocinas são produzidas por células imuno-competentes, como linfócitos e macrófagos. Pacientes deprimidos apresentam aumento de IL-1 e IL-6, e o aumento dessas citocinas pode ter relação com a severidade da doença (RAISON *et al.*, 2006). De acordo com essa teoria, a depressão maior pode ser considerada uma doença psiconeuroimunológica, pois a ativação do sistema imune periférico, através da liberação de citocinas pró-inflamatórias, é responsável por alterações neuroendócrinas e neuroquímicas associadas à patologia (SCHIEPERS *et al.*, 2005).

Desordens depressivas maiores têm sido usualmente relacionadas com bases neuroquímicas; entretanto, estudos recentes têm associado essas desordens com reduções dendríticas no SNC e no número e/ou tamanho da glia e de neurônios em determinadas regiões cerebrais como, por exemplo, o hipocampo (BERTON e NESTLER, 2006). Alterações na estrutura do sistema límbico foram relacionadas com a depressão e com a ação de antidepressivos (SHELIN *et al.*, 2003; BREMNER, 2006). Estudos *postmortem* e de neuroimagem associam reduções no volume de regiões cerebrais como córtex pré-frontal e hipocampo com pacientes deprimidos.

Essas regiões medeiam aspectos cognitivos da depressão e estão envolvidas com os sentimentos de culpa e incapacidade. Entretanto, esses estudos são inconsistentes e limitados em demonstrar alguma clara relação causa-efeito dessas alterações patológicas (KRISHNAN e NESTLER, 2008).

Fatores hereditários também estão relacionados com a etiologia da depressão (SULLIVAN *et al.*, 2000). O interesse pelos componentes genéticos da depressão motivou inicialmente os estudos genéticos-epidemiológicos, posteriormente com foco nos modelos de transmissão e mais recentemente em estudos de genética molecular. Os estudos genéticos-epidemiológicos realizados desde 1960 com famílias, gêmeos e com crianças adotadas evidenciaram a existência de um componente genético na depressão, com prevalência de 40-50% (KENDLER *et al.*, 2001). Os estudos mostram um risco três vezes maior para o desenvolvimento da patologia entre os parentes de primeiro grau de deprimidos, do que entre parentes de primeiro grau de não-deprimidos (LIMA *et al.*, 2000). A transmissão genética da depressão parece ser multifatorial e os estudos de genética molecular ainda não identificaram um *locus* específico determinante (LIMA *et al.*, 2000). Os restantes 50-60% de fatores não genéticos da depressão podem ser relacionados com traumas na infância, estresse emocional, doenças físicas e até mesmo infecções virais (BERTON e NESTLER, 2006).

1.2.3. Antidepressivos

Para o tratamento da depressão utiliza-se normalmente um grupo heterogêneo de substâncias agrupadas como agentes antidepressivos, além de tratamentos não-farmacológicos como a psicoterapia. A maioria dos antidepressivos exerce ações importantes sobre neurotransmissores e seus receptores, em particular a noradrenalina e a serotonina (OWENS *et al.*, 1997; BUCKLEY *et al.*, 2000).

Os medicamentos empregados no tratamento da depressão podem ser classificados em:

- Inibidores da Captação de Neurotransmissores:

- antidepressivos tricíclicos (TCA), por exemplo, imipramina, desipramina, amitriptilina, nortriptilina: são inibidores não-seletivos (ou em alguns casos mais seletivos para noradrenalina) da captação de monoaminas;
- inibidores seletivos da recaptção de serotonina (ISRS), por exemplo, fluoxetina, fluvoxamina, paroxetina, citalopram, sertralina e venlafaxina;
- inibidores seletivos da captação de noradrenalina, por exemplo, atomoxetina e reboxetina.
 - Inibidores de Monoamino Oxidase (IMAO), que podem inibir os subtipos A e B da MAO, por exemplo, fenelzina e tranilcipromina, ou serem seletivos para MAO-A, como a moclobemida.
 - Antidepressivos Variados: são compostos com efeito bloqueador não-seletivo de receptores, por exemplo, mianserina, bupropiona, mirtazapina, trazodona, duloxetina.

Reações tóxicas significativas são ocorrências comuns com os antidepressivos comumente usados (COSTA e SILVA, 2005). Os antidepressivos tricíclicos rotineiramente exercem efeitos autônomos adversos, em parte relacionados com suas propriedades antimuscarínicas, que incluem ressecamento da boca e gosto azedo ou metálico, desconforto epigástrico, prisão de ventre, tontura, taquicardia, palpitações, visão embaçada e retenção urinária (BALDESSARINI, 2006). Além disso, pode ocorrer hipotensão postural (por bloqueio de receptores alfa-1-adrenérgicos), sonolência (por bloqueio de receptores H1 de histamina) e ganho de peso. Hipotensão postural é proeminente com imipramina e desipramina, ao passo que sonolência e efeitos anticolinérgicos predominam com o uso de amitriptilina. Os idosos são mais sensíveis aos efeitos anticolinérgicos, podendo surgir delírios, sobretudo quando os antidepressivos são dados concomitantemente com antipsicóticos ou antiparkinsonianos com ação antimuscarínica. Ocasionalmente pode ocorrer mania, arritmias, distúrbios sexuais e efeitos extrapiramidais. Efeitos adversos mais raros são hepatotoxicidade, aplasia medular, convulsões, fotossensibilidade, efeitos cardiovasculares e neuropatia periférica (WANNMACHER, 2004).

Os inibidores da recaptação de serotonina têm menor prevalência de efeitos adversos, mas não são livres desses. Montejo-Gonzalez (1997) avaliou a incidência de disfunção sexual em pacientes que faziam uso de fluoxetina, paroxetina e sertralina. Paroxetina provocou maior retardo no orgasmo e na ejaculação e maior grau de impotência do que nos demais ISRS. Os ISRS podem causar disfunção sexual, um dos principais motivos de suspensão da terapia. A trazodona pode causar priapismo em homens, presumidamente devido a ações antiadrenérgicas, podendo levar à impotência permanente (WANNMACHER, 2004). Além disso, os ISRS apresentam alta incidência de náusea, vômitos e cefaléia.

Já os antidepressivos do tipo IMAO podem causar hipotensão postural, tonturas, hiperperexia, agitação e insônia. Podem surgir também infecções urinárias, tremores, câimbras, parestesia, distúrbios sexuais, xerostomia, náuseas, constipação, anorexia, ganho de peso e edema. Mais raros são hepatite, zumbidos, mania, erupção cutânea, espasmos musculares e reação lúpica. As interações nocivas com outros fármacos (aminas simpatomiméticas, antidepressivos tricíclicos, meperidina, l-dopa, descongestionantes e outros) e com alimentos e bebidas ricas em tiramina (cerveja, vinho tinto, queijos, banana), que levam à crise hipertensiva, são também limitantes do uso desta classe.

A eficácia clínica dos antidepressivos foi estabelecida em muitos testes clínicos bem controlados (CLAGHORN *et al.*, 1992; FABRE *et al.*, 1996; LÉPINE *et al.*, 2004; VIS *et al.*, 2005). Apesar disso, apenas um terço dos pacientes responde favoravelmente ao tratamento (COSTA e SILVA, 2005). Mesmo com os pesados investimentos da indústria na busca de novos antidepressivos, testes controlados mostram que há pouco a escolher em termos de eficácia global entre qualquer um dos fármacos atualmente em uso, mas a experiência clínica sugere que os pacientes podem responder melhor a um fármaco do que a outro (PAPAKOSTAS e FAVA, 2007; PAPAKOSTAS *et al.*, 2007). Portanto, justifica-se a continuidade das pesquisas por uma melhor compreensão das bases biológicas da depressão e dos mecanismos de ação antidepressiva, bem como a procura por novas alternativas para o tratamento dos distúrbios depressivos, com melhora na eficácia e diminuição dos efeitos adversos e tóxicos de drogas antidepressivas.

1.3. Adaptógenos

O termo adaptógeno foi inicialmente proposto na Rússia por Lazarev (1947) para definir substâncias que tenham a capacidade de aumentar um estado de resistência inespecífica do organismo frente a agentes estressores diversos; adaptógenos promoveriam um estado de adaptação às situações excepcionais (BREKHMANN e DARDYMOV, 1969). De acordo com esses autores, uma substância ou planta adaptógena deve obedecer aos seguintes requisitos: (1) mostrar uma atividade não-específica, isto é, aumentar o poder de resistência do organismo em relação a agentes nocivos de natureza física, química e biológica; (2) ter uma influência normalizadora, ou seja, contrabalançar ou prevenir os distúrbios causados por estressores; (3) ser inócua e também não influenciar o funcionamento normal do organismo mais que o necessário.

Uma melhora nas condições de saúde seria consequência do uso de um adaptógeno, que pode se manifestar, de uma maneira geral, através de melhora nos desempenhos sexual e físico, na qualidade do sono, e nas funções cognitivas (BREKHMANN e DARDYMOV, 1969; BARANOV, 1982; CARLINI, 1989). O FDA (1998) define adaptógenos como “uma nova classe de reguladores metabólicos, de origem natural, que têm demonstrado o aumento da habilidade de um organismo em se adaptar a fatores ambientais e evitar danos por tais fatores”.

Atividade adaptógena foi demonstrada com várias plantas tais como o *Panax ginseng* C.A.Mey. (WAGNER *et al.*, 1994). Conhecida há pelo menos 4000 anos na China, tradicionalmente indicada nos distúrbios psiquiátricos e neurológicos associados à terceira idade, *P. ginseng* também é conhecida por melhorar a atividade psicomotora em indivíduos saudáveis (ZHONG *et al.*, 2000). Vários estudos demonstram o efeito anti-estresse (temperatura variável, imobilização) e antifadiga (esteira rolante, roda giratória), bem como uma melhora do aprendizado em ratos tratados com o extrato ou compostos isolados de *P. ginseng* (NOCERINO *et al.*, 2000). Evidências sugerem que o ginseng pode promover a estimulação bem como a inibição da atividade cortical, podendo agir como modulador da neurotransmissão cerebral (KIM *et al.*, 1999). *P. ginseng* aumentou a atividade colinérgica em modelos

animais e demonstrou ser neuroprotetora *in vitro* (PERRY *et al.*, 1999). Além de *P. ginseng*, *Bryonia alba* L. (PANOSSIAN *et al.*, 1997), *Bacopa monniera* Wettst. (RAI *et al.*, 2003), *Withania somnifera* L. (Dunal) (BHATTACHARYA e MURUGANANDAM, 2003), *Trichopus zeylanicus* Gaertn. (SINGH *et al.*, 2001, 2005), *Rhodiola rosea* L. (PANOSSIAN e WAGNER, 2005), entre outras, têm sido estudadas como adaptógenas.

MENDES e CARLINI (2007) constataram que muitas espécies nativas brasileiras são utilizadas pela população de modo semelhante aos adaptógenos, apesar de na maior parte das vezes serem denominadas de tônicos, afrodisíacos, fortificantes, “arrebites”, ativadores de memória, entre outros termos. Algumas destas espécies já foram avaliadas em parâmetros relacionados à atividade adaptógena (como, por exemplo, atividade anti-estresse, nootrópica e/ou melhora no desempenho físico e sexual), incluindo: *Ptychopetalum olacoides* Benth (Olacaceae), *Heteropterys aphrodisiaca* Machado (Malpighiaceae), *Paullinia cupana* Kunth (Sapindaceae), *Turnera diffusa* Willd. ex Schult. (Turneraceae), *Pfaffia glomerata* Pedersen (Amaranthaceae), *Pfaffia paniculata* Kuntze (Amaranthaceae) e *Trichilia catigua* A. Juss (Meliaceae).

Apesar de não estarem claros os mecanismos pelos quais os adaptógenos atuam, acredita-se que podem agir modulando mediadores de resposta ao estresse, como catecolaminas, corticosteróides e óxido nítrico, entre outros (PANOSSIAN *et al.*, 1999; REGE *et al.*, 1999). Podem ainda apresentar, de maneira complementar ou sinérgica, atividades antioxidante, imunomodulatória, hipoglicêmica e hipocolesterolêmica, entre outras (DAVYDOV e KRIKORIAN, 2000). Estudos indicam que a administração aguda de *P. ginseng* e *Eleutherococcus senticosus* Maxim. (Araliaceae) ativa a síntese de ACTH e corticosteróides e o tratamento sub-crônico leva a normalização dos níveis desse hormônio (DADAYAN e PANOSSIAN, 1987; PANOSSIAN *et al.*, 1987). Esse aumento da secreção de corticosteróide com subsequente estabilização parece ser um dos mecanismos pelos qual um adaptógeno aumenta a capacidade de um organismo para lidar com o estresse (PANOSSIAN *et al.*, 1999), de alguma forma modulando a responsividade do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal. Outro marcador envolvido na resposta de estresse e modulado pelos

adaptógenos é o óxido nítrico (NO), que está envolvido também na resposta imunológica (GILLS, 1997; PANOSSIAN *et al.*, 1999a). PANOSSIAN e col. (1999b) demonstraram que o NO pode ser um marcador para avaliar o efeito protetor de um adaptógeno contra o estresse.

1.4. *Ptychopetalum olacoides*: etnofarmacologia e perfil psicofarmacológico

Ptychopetalum olacoides Benth (Olacaceae) (PO) (Figura 1) é uma planta tradicionalmente utilizada pelos caboclos da Amazônia como “tônico dos nervos”, um tratamento para uma síndrome chamada de “fraqueza dos nervos”, relacionada tanto a sintomas de depressão como de ansiedade e agitação psicomotora (ELISABETSKY *et al.*, 1992). A síndrome descrita “fraqueza dos nervos” inclui vários sintomas, enfatizando-se: fraqueza ou preguiça, falta de vontade/interesse, impotência sexual e tremores (ELISABETSKY *et al.*, 1992). Os “tônicos dos nervos ou nervinos” são utilizados principalmente por idosos ou convalescentes de doenças em geral e, especificamente, daquelas que afetam o SNC (como “derrames”, dificuldades de concentração, melhora do estado geral de atenção); são também indicados durante períodos de grande estresse físico ou mental para usuários de qualquer idade (SIQUEIRA *et al.*, 1998).

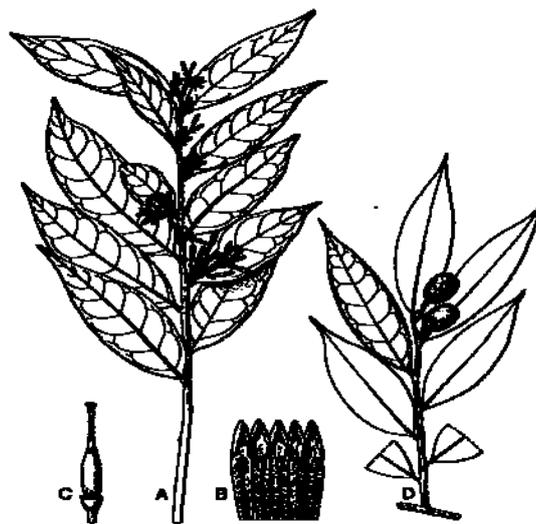


Figura 1. *Ptychopetalum olacoides* Bentham (Olacaceae). A = hábito e inflorescência; B e C = detalhes das flores; D = ramo com frutos. Fonte: SLEUMER, p.134 (1984).

A compreensão da síndrome e de seus sintomas associados permite entender por que muitas das espécies usadas pelos caboclos para tratar “fraqueza dos nervos” acabam sendo mais conhecidas como afrodisíacos do que pelas outras propriedades alegadas; na verdade, algumas das espécies usadas como afrodisíacos são também indicadas para promover o apetite, como estimulantes dos nervos ou estimulantes gerais (nesse caso transformados pelo mercado fitoterápico e de suplementos alimentares em “arrebites” ou “rebites”). Espécies pertencentes a diversas famílias são usadas como fonte de “tônico dos nervos”, destacando-se Apocynaceae, Convolvulaceae, Euphorbiaceae, Loganaceae, Malphigiaceae e Rubiaceae, famílias com freqüente presença de alcalóides e produtoras de compostos com reconhecidas atividades centrais. Embora PO seja uma das plantas mais usada pelos caboclos amazônicos como “tônico dos nervos” (ELISABETSKY *et al.*, 1992), é mais conhecida como afrodisíaco (YOUNGKEN, 1921; STEINMETZ, 1962; FONSECA, 1981; SANGIRARDI, 1981; CABRAL e AGRA, 1996). Tradicionalmente, são as raízes que são preparadas em infusão alcoólica (em cachaça ou em vinho), mas é encontrada no mercado de fitoterápicos também em várias outras formulações comerciais (pó seco, liofilizado, tinturas, misturas de extratos, composições polivitamínicas).

O uso de PO é amplamente relatado também em outros lugares da Amazônia, inclusive a não-brasileira (SIQUEIRA *et al.*, 1998), e é encontrada em fitoterápicos no Brasil, Europa e Estados Unidos da América, sendo comercializada inclusive via internet. Freqüentemente são encontradas formulações de marapuama em associação com outras plantas (tais como catuaba, ginseng, guaraná) ou em complexos vitamínicos (Muir Puama-Herb-Pharm[®]). As alegadas propriedades terapêuticas desses fitoterápicos incluem melhora do desempenho físico e mental, além de estimulante sexual.

A descrição da síndrome caracterizada como “fraqueza dos nervos” inclui sintomas comuns à depressão, já que se pode interpretar parte dos sintomas descritos como anedonia. O extrato etanólico de PO (EEPO) foi ativo (50-200 mg/kg) em testes com valor preditivo para antidepressivos, como proteção da letalidade induzida por ioimbina e reversão de ptose induzida por reserpina (SIQUEIRA *et al.*, 1998),

sugerindo uma possível ação no sistema noradrenérgico e/ou dopaminérgico. Seu perfil farmacológico inclui ainda atividade antioxidante *in vitro* e *in vivo* (SIQUEIRA *et al.*, 2002; 2007), neuroprotetora (SIQUEIRA *et al.*, 2004), ação anticolinesterásica *in vitro* e *in vivo* (SIQUEIRA *et al.*, 2003) em várias regiões do sistema nervoso central e ação pró-mnéstica tanto em camundongos adultos (da SILVA *et al.*, 2004; 2007; 2008) como em animais de 14 meses com déficit de memória (da SILVA *et al.*, 2004) e reversão de amnésias induzidas por escopolamina e MK801 (da Silva *et al.*, 2009).

Considerando o extenso uso de *P. olacoides*, é surpreendente a parcimônia de dados fitoquímicos em relação a essa espécie. Embora a literatura (Perkolt, 1901; Duke, 1992) mencione presença de alcalóides nas raízes de PO, essa informação parece vir de um resultado falso-positivo dos testes usados na época, já que alcalóides não podem ser obtidos com processos mais modernos e específicos de extração. Em realidade, relatos da presença de alcalóides nessa espécie podem ser apenas o resultado de uma leitura errada dos dados originalmente relatados, já que Perkolt (1901) nunca afirmou que os cristais obtidos fossem alcalóides. Ainda que estes cristais tenham sido mais tarde caracterizados como longas cadeias de ésteres de beta-sitosterol e lupeol, foram na época chamados de “muyrapuaimin”, talvez pela interpretação equivocada da descrição do método de isolamento usado por Perkolt. Infelizmente, como é comum nesta área do saber, os mesmos dados são repetidos em diversas publicações, dando a falsa aparência de dado confiável. Em trabalho apresentado no XVII Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil (Cuiabá-MT), Montrucchio e col. (2002) isolaram e identificaram onze substâncias em PO, sendo elas: ácido palmítico, ácido esteárico, estigmasterol, β -sitosterol, α -amirina, glutinol, lupeol, β -sitosterol glicosilado, cafeína, adenina e teobromina. Apenas os três últimos compostos (xantinas) não haviam sido reportados na espécie. Em estudo recente realizado por Tang e col. (2009), novos compostos foram identificados em um extrato metanólico de cascas de *P. olacoides*. Entre eles, quatro diterpenos (6a,7a-dihydroxyannonena, 7a,20-dihidroxiannonene, 7a-hidroxisolidagolactona I e pticho-6a,7a-diol) foram identificados, e os dois primeiros apresentaram propriedades neurotróficas. Cabe notar que estes compostos foram isolados da casca em quantidade diminuta, indicando ser pouco provável que possam

ser os responsáveis pela atividade relatada em humanos. É importante ressaltar que a identificação da espécie não foi feita por especialista e não há exsicata depositada.

Os resultados com EEPO foram suficientemente robustos para que a UFRGS depositasse no INPI, em 2002 e 2003, requisição de patente para usos específicos de extratos de espécies do gênero *Ptychopetalum* em doenças crônico-neurodegenerativas (PI0205432-9/RP004142-RS). Os estudos parciais publicados antes do depósito da patente já haviam chamado atenção, com duas patentes sobre a espécie depositadas por japoneses, uma por britânicos e uma nos EUA. No entanto, nenhuma das patentes anteriores à depositada pelo nosso grupo de pesquisa da UFRGS descreve quaisquer dados biológicos ou identifica princípios ativos dos extratos mencionados. Embora ainda não tenha sido possível esclarecer em definitivo a(s) classe(s) de composto(s) responsável (eis) pelas ações detectadas com EEPO, foi identificado um marcador para caracterizar a espécie de forma inequívoca (já que há muita adulteração no mercado) e a presença de vários compostos de uma mesma classe com atividade anticolinesterásica cujos detalhes encontram-se ainda em sigilo associado às patentes acima.

Uma melhor caracterização da atividade antidepressiva e a identificação da atividade adaptógena deste extrato, objetivos desta tese, não apenas complementam os estudos anteriores, mas podem alimentar a patente depositada e/ou levar ao depósito de novas patentes.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos Gerais

Considerando os usos populares de Marapuama e os dados preliminares obtidos em modelos animais, esse estudo teve como objetivos gerais:

- A) investigar a atividade antidepressiva de um extrato etanólico padronizado de *Ptychopetalum olacoides* (EEPO) em diversos modelos animais;
- B) esclarecer a participação dos sistemas noradrenérgico, dopaminérgico e serotoninérgico no mecanismo de ação antidepressiva de EEPO;
- C) verificar se EEPO apresenta efeitos anti-estresse (adaptógeno);
- D) verificar se EEPO apresenta efeitos anti-fadiga;
- E) verificar se EEPO tem efeitos sobre o gasto energético e o dano muscular induzido por exercício

2.2. Objetivos Específicos

2.2.1. Atividade Antidepressiva

- a) Avaliar a atividade de EEPO nos modelos de nado forçado (FST) e suspensão pela cauda (TST);
- b) Avaliar o efeito da inibição da síntese de serotonina no efeito de EEPO nos modelos de nado forçado e suspensão pela cauda;
- c) Avaliar o efeito da inibição de noradrenalina/dopamina no efeito de EEPO nos modelos de nado forçado e suspensão pela cauda;
- d) Verificar o efeito de antagonistas noradrenérgicos, dopaminérgicos e serotoninérgicos sobre a atividade tipo antidepressiva de EEPO nos modelos de nado forçado e suspensão pela cauda;

- e) Verificar o efeito de EEPO no modelo do estresse crônico imprevisível (unpredictable chronic mild stress, UCMS);
- f) Verificar o efeito de EEPO nos níveis de corticosterona de camundongos submetidos ao UCMS.

2.2.2. Atividade adaptógena:

- a) Avaliar o comportamento de camundongos submetidos ao UCMS e tratados com EEPO no modelo de claro-escuro;
- b) Avaliar a glicemia de camundongos submetidos ao UCMS e tratados com EEPO;
- c) Verificar o efeito de EEPO quanto à resistência de camundongos à hipóxia;
- d) Avaliar a atividade de EEPO quanto à resistência ao nado;
- e) Analisar o efeito de EEPO nos níveis de glicogênio (muscular e hepático), glicose, lactato e ácidos graxos livres após exercício de nado;
- f) Analisar o efeito de EEPO nos níveis de creatina cinase (CK) e lactato desidrogenase (LDH) após exercício (nado).

3. ARTIGOS CIENTÍFICOS

3.1. Ângelo L. Piato; Lucas P. Rizon; Bárbara S. Martins; Domingos S. Nunes; Elaine Elisabetsky. **Antidepressant profile of *Ptychopetalum olacoides* Bentham (Marapuama) in mice** (Artigo publicado no periódico *Phytotherapy Research* 2009; 23: 519-524).

Antidepressant Profile of *Ptychopetalum olacoides* Bentham (Marapuama) in Mice

Ângelo L. Piato^{1,2}, Lucas P. Rizon², Bárbara S. Martins², Domingos S. Nunes³ and Elaine Elisabetsky^{1,2,*}

¹Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 90610-000, Brazil

²Laboratório de Etnofarmacologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 90050-170, Brazil

³Departamento de Química, Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, PR, 84030-310, Brazil

Depression has become of universal major importance, and it is therefore vital to expand the armamentarium for treating the condition. Lack of motivation and lassitude are major symptoms treated with the use of Marapuama (*Ptychopetalum olacoides*, PO) remedies by communities in the Brazilian Amazon. Considering the prominence of such symptoms in depression, the present study was designed to verify the effects of a standardized PO ethanol extract (POEE) on the forced swimming (FST) and tail suspension tests (TST). POEE i.p. (15–100 mg/kg) and oral (300 mg/kg) resulted in a significant and dose-related anti-immobility effect. We further examined the involvement of dopamine, noradrenaline and serotonin in these antidepressant-like effects. POEE effects were prevented when catecholamine synthesis was inhibited by α -methyl- ρ -tyrosine (AMPT) (100 mg/kg, i.p.), while inhibition of serotonin synthesis with ρ -chlorophenylalanine methyl ester hydrochloride (PCPA) (100 mg/kg, i.p.) was devoid of effect. The blockade of β -adrenergic (propranolol 2 mg/kg, i.p.) and D₁ dopamine (SCH 23390 0.5 mg/kg, i.p.) receptors prevented POEE anti-immobility effects; by contrast, blockade of D₂ dopamine (sulpiride 2 and 50 mg/kg, i.p.) receptors was ineffective. Consistent with traditional use, the results indicate that POEE possesses antidepressant-like effects, possibly mediated by β -adrenergic and D₁ dopamine receptors. Copyright © 2008 John Wiley & Sons, Ltd.

Keywords: *Ptychopetalum olacoides*; Marapuama; Muirapuama; antidepressant; catecholamine; serotonin.

INTRODUCTION

It is recognized that depression is associated with considerable morbidity and mortality, unfortunately with a consistently high prevalence worldwide. The lifetime prevalence of depression has been estimated to be as high as 21% of the general population in some developed countries (Wong and Licinio, 2001). Despite the introduction of various classes of antidepressants, including tricyclics (TCA), selective reversible inhibitors of monoamine oxidase, selective serotonin reuptake inhibitors (SSRI) and specific serotonin-noradrenaline reuptake inhibitors, the treatment of depression is not entirely satisfactory. All clinically used antidepressants have a slow onset of action, present significant undesirable side effects, and lack the desired efficacy in a significant proportion of patients (Healy, 2006). The excellent patient acceptance (Bilia *et al.*, 2002) of Saint John's Wort (*Hypericum perforatum* L., Hypericaceae) has drawn attention to plant extracts as potential sources of highly desirable new and innovative antidepressant agents.

Although traditional concepts of health are not always easily translated into biomedical nosological categories, several traditionally used plant species have shown anti-

depressant activity in animal models, including *Bacopa monniera* Wettst (Sairam *et al.*, 2002), and *Clitoria ternatea* L. (Jain *et al.*, 2003). *Ptychopetalum olacoides* Bentham (PO) (Olacaceae), known as Marapuama or Muirapuama, is used by Amazonian peoples for treating 'nervous weakness', a syndrome that includes lassitude, a general lack of desire or motivation ('a man loses interest even for soccer and women'), tremors and sexual impotence as prominent symptoms (Elisabetsky and Siqueira, 1998). The species is also indicated to facilitate recovery from stroke, and for coping with highly stressful (physically and/or psychologically) circumstances (Elisabetsky and Siqueira, 1998). Coherent with such traditional claims, relevant neuroprotective and memory facilitating effects were identified with a specific PO root ethanol extract (POEE) (Siqueira *et al.*, 2004; da Silva *et al.*, 2007).

Despite major limitations (Willner, 1990), animal models have been useful not only in detecting antidepressant properties of new drugs, but also in identifying the neurotransmitter systems that underlie their mechanisms of action. We have previously established that POEE potentiates yohimbine-induced lethality, and reverses reserpine-induced ptosis (Siqueira *et al.*, 1998), indicating potentiation of catecholaminergic activity. The aim of the present study was to verify the effects of POEE in the forced swimming (FST) and tail suspension tests (TST), two widely used screening tests for antidepressants. In addition, the involvement of dopamine, noradrenaline, and serotonin receptors in POEE effects was investigated.

* Correspondence to: Elaine Elisabetsky, Laboratório de Etnofarmacologia, ICBS, UFRGS, Av. Sarmiento Leite 500/202, 90050-170, Porto Alegre, RS, Brazil.
 E-mail: elaine.elisabetsky@gmail.com

METHODS

Animals. Experiments were performed with two-month-old male (CF1, 40–50 g) mice, obtained from the Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (FEPPS). Mice were housed eight per cage (40 × 33 × 16 cm) and maintained in our own animal facility, under controlled environmental conditions (22 ± 1 °C, 12-hr light/dark cycle, free access to food [Nuvilab CR1] and water) for at least two weeks before experiments. All procedures were carried out in accordance with institutional policies on the handling of experimental animals (approved by the ethics committee, process 2006543) which follow the NIH guidelines (NIH Guide for Care and Use of Laboratory Animals, NIH publication No. 85-23, 1985).

Extract. Roots of *Ptychopetalum olacoides* Benth (Olaaceae) were collected in Pará (Brazil) and identified by Nelson Rosa (MPEG 108.036, Goeldi Museum). Collections were carried out according to national guidelines associated with the United Nations Convention on Biodiversity. *P. olacoides* ethanol extract (POEE) was prepared as detailed elsewhere (Elisabetsky and Siqueira, 1998); briefly, dried ground roots (2.5 kg) were extracted with ethanol (12 L) in Soxhlet (40 h), and this was evaporated under reduced pressure (6% yield). Analytical HPLC was carried out on an HP 1100 system equipped with a photodiode array detector (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, United States) and HPLC fingerprinting was performed as detailed elsewhere (Siqueira *et al.*, 2007).

Drugs. Imipramine HCl, DL-propranolol HCl, R (+)-SCH 23390 HCl, (±)-Sulpiride, D,L- α -methyl- β -tyrosine (AMPT), ρ -chlorophenylalanine methyl ester hydrochloride (PCPA) were acquired from Sigma (St Louis, MO, USA). All drugs were dissolved in saline (NaCl 0.9%), with the exception of POEE dissolved in DMSO 20%. Drugs and vehicles were injected intraperitoneally (i.p.) or orally (p.o.) in a constant volume of 0.1 ml/10 g body weight.

Locomotion. Locomotion was measured in activity cages (45 × 25 × 20 cm, Albarsch Electronic Equipment, Brazil, Porto Alegre, RS), equipped with three parallel photocells, automatically recording the number of crossings. Groups (n = 10) of mice were treated with saline (i.p. or p.o.), DMSO 20% (i.p. or p.o.) or POEE (10, 15, 25, 50 and 100 mg/kg i.p., or 100 and 300 mg/kg p.o.). Mice were individually placed in the activity cages 30 (i.p.) or 90 (p.o.) min after treatments, and locomotion was recorded for 6 min. The effects of antagonists in locomotion were likewise evaluated, with the drug schedules as indicated.

Tail Suspension Test (TST). The TST was used as described by Steru *et al.* (1985): mice were suspended 50 cm above the bench by means of a piece of adhesive tape placed approximately 1 cm from the tip of the tail. Mice were observed for 6 min, and the immobility time was recorded on a stopwatch; mice were considered to be immobile when hanging passively and motionless. Mice were submitted to the TST 30 or 90 min (for i.p. and p.o. treated groups, respectively) after treatments. Groups (n = 10–12) of mice were treated as described

in locomotion protocol, with an additional group treated with imipramine (20 mg/kg, i.p.).

Forced Swimming Test (FST). The FST followed Sunal *et al.* (1994). Briefly, mice were gently dropped individually into plastic cylinders (height: 30 cm, diameter: 24 cm) containing 18 cm of water (25 ± 1 °C), and observed for 6 min. The duration of immobility was recorded on a stopwatch during the last 4 min, after which mice were immediately removed from the apparatus and towel dried. A mouse was judged to be immobile when it floated in an upright position, making only small movements to keep its head above the water. Groups (n = 9–12) of mice were treated as described in locomotion protocol (except POEE 10 and 15 mg/kg), and with an additional group treated with imipramine (15 mg/kg, i.p.). Mice were submitted to the FST 30 or 90 min (for i.p. and p.o. treated groups, respectively) after treatments.

Inhibition of monoamine synthesis. AMPT was used to inhibit the synthesis of dopamine and noradrenaline, while PCPA inhibited that of serotonin. Doses of the inhibitors were selected from literature (Rojas-Corales *et al.*, 1998; Rodrigues *et al.*, 2002) and tested by pilot experiments; selected doses do not modify immobility time in the models here used. Groups of mice received saline or AMPT (100 mg/kg, i.p.) 24 and 2 h before saline, imipramine (20 mg/kg, i.p.) or POEE (25 mg/kg, i.p.); 30 min later mice were subjected to the TST. Additional groups were treated with saline or PCPA (100 mg/kg, i.p.), once a day for 4 consecutive days; 15 min after the last PCPA treatment groups received saline, fluoxetine (32 mg/kg, i.p.) or POEE (25 mg/kg, i.p.) and 30 min later were subjected to the TST.

Effects of antagonists on POEE actions in the FST and TST. Appropriate doses for antagonists were selected from literature (Renard *et al.*, 2001; Rodrigues *et al.*, 2002; Zomkowski *et al.*, 2004) as well as pilot experiments, and were used doses that do not modify immobility. Groups of mice received saline or antagonists (propranolol 2 mg/kg, SCH 23390 0.5 mg/kg, or sulpiride 2 and 50 mg/kg) 15 min before vehicle (DMSO 20%, i.p.), imipramine (15 or 20 mg/kg, i.p.) or POEE (25 mg/kg, i.p.), and were submitted 30 min later to the FST or TST.

Statistical analysis. Results (cumulative counts for locomotion or time in seconds for immobility) are expressed as mean ± SEM. Comparisons between groups were made by ANOVA followed by Student-Newman-Keuls (SNK), using SPSS 10.0. Other results were analyzed by two-way ANOVA followed by Tukey's test. A value of $p < 0.05$ was considered significant.

RESULTS

Locomotion of groups treated with POEE i.p. or orally did not differ from controls ($F(8,87) = 1.2$, data not shown). There was no significant effect of antagonists or synthesis inhibitors in locomotion ($F(7,41) = 0.67$, Table 1). As can be seen in Table 2, i.p. and p.o. POEE significantly reduced immobility in the TST (i.p.: $F(7,114) = 37.9$; p.o.: $F(4,52) = 48.9$, $p < 0.05$) and FST

Table 1. The effects of saline and antagonists on locomotion

Treatment	Dose (mg/kg)	Locomotion (means \pm S.E.M)
Saline		139.6 \pm 7.6
DMSO	20%	135.5 \pm 4.8
AMPT	100	131.2 \pm 13.1
PCPA	100	120.8 \pm 9.5
SCH 23390	0.5	137.0 \pm 6.4
Sulpiride	2	126.4 \pm 10.8
	50	129.0 \pm 5.2
Propranolol	2	120.4 \pm 11.7

(i.p.: $F(5,67) = 31.6$; p.o.: $F(4,52) = 25.7$, $p < 0.05$). Imipramine was more active than POEE in both tests.

Figure 1A shows the influence of AMPT on the effects of imipramine and POEE in the TST. A two-way ANOVA revealed a main effect of pretreatment ($F(1,65) = 151.6$, $p < 0.01$), treatment ($F(3,65) = 59.0$, $p < 0.01$), and of pretreatment \times treatment interaction ($F(2,65) = 40.2$, $p < 0.01$). Post hoc analyses indicated that pretreatment with AMPT prevented the effects of POEE and imipramine in the TST. Figure 1B shows the influence of PCPA on the effects of fluoxetine and POEE in the TST. A two-way ANOVA likewise revealed a main effect of pretreatment ($F(1,70) = 23.5$, $p < 0.01$), treatment ($F(3,70) = 51.4$, $p < 0.01$), and of pretreatment \times treatment interaction ($F(2,70) = 35.2$, $p < 0.01$). Post hoc analyses indicated that the pretreatment with PCPA prevented the effect of fluoxetine, but not that of POEE, in the TST.

Figure 2A shows the influence of SCH23390 on the effects of imipramine and POEE in the FST. A two-way ANOVA revealed a main effect of pretreatment ($F(1,54) = 44.9$, $p < 0.01$), treatment ($F(2,54) = 40.5$, $p < 0.01$), and of pretreatment \times treatment interaction ($F(2,54) = 16.5$, $p < 0.01$). Post hoc analyses indicated that the pretreatment with SCH23390 prevented the effects of POEE and imipramine in the FST. Figure 2B shows the influence of sulpiride on the effects of imipramine and POEE. A two-way ANOVA also revealed a main effect of pretreatment ($F(2,127) = 32.4$, $p < 0.01$), treatment ($F(3,127) = 68.5$, $p < 0.01$), and of pretreatment \times treatment interaction ($F(4,127) = 28.7$, $p < 0.01$). Post hoc analyses indicated that the pretreatment with sulpiride blocked the effect of imipramine, but not that

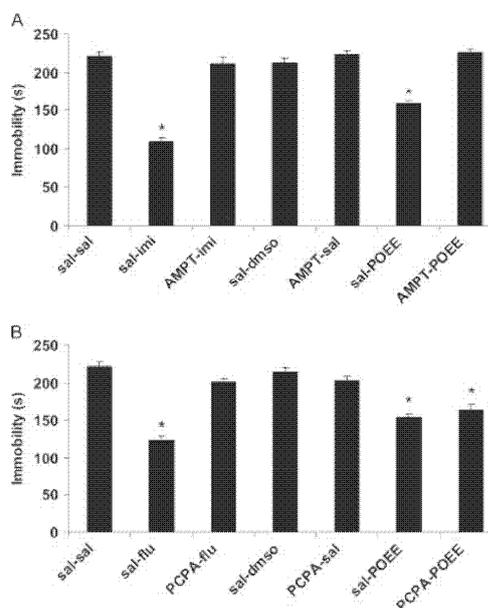


Figure 1. Effects of AMPT (1A) and PCPA (1B) on POEE actions in the TST. Saline (SAL), AMPT 100 mg/kg, PCPA 100 mg/kg, POEE 25 mg/kg, imipramine (IMI) 20 mg/kg, fluoxetine (FLU) 32 mg/kg. Each column represents the mean \pm S.E.M. $n = 9-11$. * $p < 0.05$ \times saline-saline, ANOVA/Tukey.

of POEE, in the FST. Figure 2C shows the influence of propranolol on imipramine and POEE effects in the FST. A two-way ANOVA revealed a main effect of pretreatment ($F(1,66) = 78.6$, $p < 0.01$), treatment ($F(3,66) = 28.4$, $p < 0.01$), and of pretreatment \times treatment interaction ($F(2,66) = 16.8$, $p < 0.01$). Post hoc analyses indicated that the pretreatment with propranolol blocked the effects of both POEE and imipramine in the FST.

Figure 3A shows the influence of SCH23390 on the effects of imipramine and POEE in the TST. A two-way ANOVA revealed a main effect of pretreatment ($F(1,65) = 55.5$, $p < 0.01$), treatment ($F(3,65) = 40.4$, $p < 0.01$), and of pretreatment \times treatment interaction

Table 2. Effects of imipramine and POEE in tail suspension and forced swimming tests (immobility time, sec)

Treatment	Dose (mg/kg)	Tail Suspension Test		Forced Swimming Test	
		i.p.	p.o.	i.p.	p.o.
Saline		228.0 \pm 4.6	230.9 \pm 7.5	164.5 \pm 3.6	156.6 \pm 4.6
DMSO		221.0 \pm 4.2	234.5 \pm 7.1	173.5 \pm 4.6	164.8 \pm 4.7
Imipramine	15			64.6 \pm 4.0**	
	20	112.0 \pm 6.4**	1		
POEE	10	221.5 \pm 7.0			
	15	191.0 \pm 13.3*			
	25	139.0 \pm 8.7* ¹		91.1 \pm 10.4* ¹	
	50	156.5 \pm 8.7*		122.2 \pm 13.8*	
	100	178.0 \pm 13.2*	232.6 \pm 6.1	136.2 \pm 10.6*	156.6 \pm 9.3
	300		200.2 \pm 7.5*		125.8 \pm 9.3*

* $p < 0.05$ \times controls (saline and DMSO); * $p < 0.05$ \times POEE; ¹ $p < 0.05$ \times all other POEE doses, ANOVA/SNK. ¹ Imipramine, i.p.: 120.1 \pm 5.8**; ² Imipramine, i.p.: 75.0 \pm 4.6**, ANOVA/SNK.

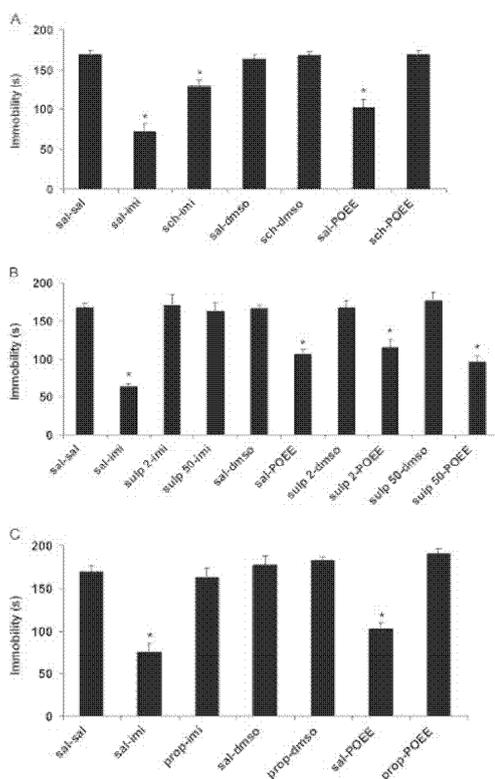


Figure 2. Effects of SCH 23390 (SCH, 0.5 mg/kg, **2A**) sulpiride (SULP, 2 and 50 mg/kg, **2B**) and propranolol (PROP, 2 mg/kg, **2C**) on the actions of POEE (25 mg/kg) and imipramine (IMI, 15 mg/kg) in the FST. Each column represents the mean \pm S.E.M. $n = 9-11$. * $p < 0.05 \times$ saline-saline, ANOVA/Tukey.

($F(2,65) = 9.5$, $p < 0.01$). Post hoc analyses indicated that the pretreatment with SCH23390 blocked the effects of POEE and imipramine in the TST. Figure 3B shows the influence of propranolol on the effects of imipramine and POEE in the TST. A two-way ANOVA revealed a main effect of pretreatment ($F(1,66) = 47.2$, $p < 0.01$), treatment ($F(3,66) = 83.7$, $p < 0.01$), and of pretreatment \times treatment interaction ($F(2,66) = 11.4$, $p < 0.01$). Post hoc analyses indicated that the pretreatment with propranolol attenuated the effect of imipramine and blocked that of POEE in the TST.

DISCUSSION

Despite eventually leading to false-positive results, the FST and TST are animal models that have been useful in predicting clinical efficacy for several categories of antidepressants (Steru *et al.*, 1985). The characteristic behavior scored in these tests is immobility (Willner, 1990); however, in analyzing the present findings, changes in motor activity caused by stimulatory or sedative effects of POEE or antagonists can be ruled out, since none of the doses used in this study had significant

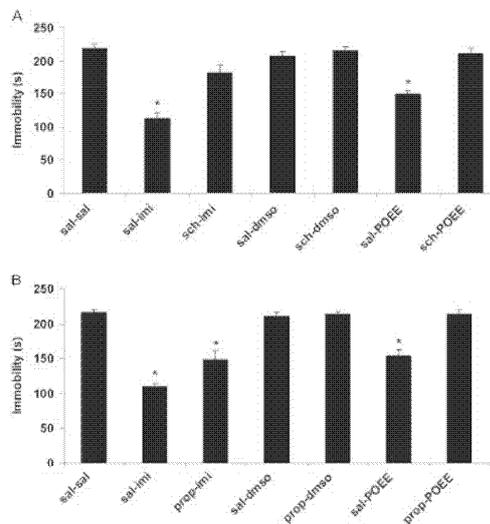


Figure 3. Effects of SCH 23390 (SCH, 0.5 mg/kg, **3A**) and propranolol (PROP, 2 mg/kg, **3B**) on the actions of POEE (25 mg/kg) and imipramine (IMI 20 mg/kg) in the TST. Each column represents the mean \pm S.E.M. $n = 9-11$. * $p < 0.05 \times$ saline-saline, ANOVA/Tukey.

effects on locomotion. POEE significantly and dose-dependently decreased immobility in the two mouse models, when given i.p. or orally. In the FST the effect was dose-related ($r = -0.31$, $p < 0.05$, Pearson correlation analysis), while in the TST the effect presented an inverted U shape with the intermediate dose being more active. A similar U shaped dose-effect curve was also observed with *Hypericum perforatum* L. (Butterweck *et al.*, 2002) in animal models, as well as with nortriptyline, both in animal models and in the clinic (Reis de Oliveria *et al.*, 1990). It is likely that isolated active compound(s) and/or purified formulations would reveal smaller active dosages and differ in their dose-effect profile.

In agreement with previously reported data, AMPT inhibited the effect of imipramine (De Montis *et al.*, 1993), while PCPA inhibited the effect of fluoxetine in the TST (Rodrigues *et al.*, 2002). The effect of these synthesis inhibitors in the TST indicates that POEE antidepressant-like activity may be mediated by dopamine and/or noradrenaline, but not by serotonin. Additionally, SCH 23390, propranolol and sulpiride significantly inhibited the effect of imipramine in the FST (Mancinelli *et al.*, 1991; D'Aquila *et al.*, 1994). POEE activity was affected (reversed or attenuated) by SCH 23390 (but not by sulpiride in doses known to inhibit TCAs and SSRIs), and by propranolol in both models, indicating that POEE antidepressant-like activity may be mediated by dopaminergic D_1 and β -noradrenergic receptors.

Despite major attention lately given to the involvement of serotonin in depression, early studies of depressed patients pointed to a significant role for noradrenaline (NA) and dopamine (D'Aquila *et al.*, 2000). Several studies have established that most antidepressants, including those with minimal direct biochemical effects on NA, can influence noradrenergic systems (Miller *et al.*,

2001). Thus, a decreased 24-hour excretion of NA and its major metabolites has been observed with lithium, electroconvulsive therapy, the dopamine reuptake inhibitor bupropion, and the serotonin (5-HT) reuptake inhibitor zimelidine (Golden *et al.*, 1988). Consequently, it has been suggested that increased noradrenergic function is an integral component of antidepressant treatments, or represents one specific way by which an antidepressant effect can be achieved through pharmacological treatment (Miller *et al.*, 2001). Accordingly, the data justify the noradrenergic system as a major research focus in this field (Miller *et al.*, 2001).

β -adrenergic receptors are down regulated in several brain areas after long-term treatment with most antidepressants, and this receptor has been repeatedly implicated in the pathogenesis of depression and the actions of antidepressants. The relevance of β -adrenergic receptors for POEE anti-immobility effects is therefore significant and a β -adrenergic modulation is consistent with the increase in yohimbine-induced lethality observed with POEE treatment (Siqueira *et al.*, 1998).

Relevant for social functioning, the role of noradrenaline in improving patients' energy, interest and motivation is listed as one of the advantages of selective noradrenaline reuptake inhibitors (Brunello *et al.*, 2002). As mentioned earlier, lack of energy, motivation and interest are symptoms usually taken into account by healers when suggesting treatments with *P. olacoides*-based remedies.

Dopamine has recently been associated with depression and antidepressant treatments by several lines of evidence (Dunlop and Nemeroff, 2007). Because human depressive syndromes are characterized by anhedonia and loss of motivation, it makes sense that antidepressants that preferentially facilitate dopamine transmission in mesolimbic areas (crucially involved in reward mechanisms and motivation) would be beneficial in the reversal of depressive states (D'Aquila *et al.*, 2000). A decrease in the density of dopamine D₁ receptors (assessed by PET scan) was reported in depressed humans (Suhara *et al.*, 1992). Consistent with the hypothesis that an enhanced neurotransmission at the dopamine

D₁ receptor might result in antidepressant effects, acute administration of selective dopamine D₁ agonists has antidepressant effects similar to that of chronic imipramine in both the FST and the learned helplessness procedures (D'Aquila *et al.*, 2000). Moreover, acute treatment with SCH 23390 (but not with sulpiride) suppresses the effect of chronic imipramine in these models (Gambarana *et al.*, 1995), and antagonizes the anti-immobility effects of bupropion and nomifensine in the FST (Yamada *et al.*, 2004). Comparable with this study, the acute effects of several SSRIs (Renard *et al.*, 2001,) and a semi-synthetic ester of hyperforin (Cervo *et al.*, 2005) in the FST were reversed by D₁ and D₂ antagonists. Conversely, the dopamine D₁ agonist SKF 38393 enhances the anti-immobility effects of selective serotonin re-uptake inhibitors, including paroxetine and fluvoxamine (Renard *et al.*, 2001). The involvement of the D₁ dopamine receptor in the effects of POEE in the FST and TST is consistent with these hypotheses linking dopamine and depression, as well as with the reported ability of the extract to reverse reserpine-induced ptosis (Siqueira *et al.*, 1998).

In conclusion, we here provide further evidence that a standardized ethanol extract from *P. olacoides* possesses antidepressant properties in validated mouse models. The effects of POEE appear to require the D₁ dopamine and the β -noradrenergic receptors, both shown to be relevant for antidepressant effects of other antidepressant drugs. Clinical studies and the identification of active antidepressant components of the extract are necessary to further assess the therapeutic potential of this species in the treatment of depression. Nevertheless, its traditional medical use is a strong indication of bioavailability and consistent with the experimental profile here reported.

Acknowledgements

This study is associated with patents PI0205432-9/PI0307647-4 (INPI/BR). The authors are grateful to CAPES, CNPq and PROPESQ (UFRGS) for fellowships and support.

REFERENCES

- Bilia AR, Gallori S, Vincieri FF. 2002. St. John's wort and depression: efficacy, safety and tolerability—an update. *Life Sci* **70**: 3077–3096.
- Brunello N, Mendlewicz J, Kasper S, Leonard B, Montgomery S, Nelson J, Paykel E, Versiani M, Racagni G. 2002. The role of noradrenaline and selective noradrenaline reuptake inhibition in depression. *Eur Neuropsychopharmacol* **12**: 461–475.
- Butterweck V, Jurgeniemk G, Nahrstedt A, Winterhoff H. 2002. Flavonoids from *Hypericum perforatum* show antidepressant activity in the forced swimming test. *Planta Med* **66**: 3–6.
- Cervo L, Mennini T, Rozio M, Ekalle-Soppo CB, Canetta A, Burbassi S, Guiso G, Pirona L, Riva A, Morazzoni P, Caccia S, Gobbi M. 2005. Potential antidepressant properties of IDN 5491 (hyperforin-trimethoxybenzoate), a semisynthetic ester of hyperforin. *Eur Neuropsychopharmacol* **15**: 211–218.
- da Silva AL, Piato AL, Ferreira JG, Martins BS, Nunes DS, Elisabetsky E. 2007. Promnesic effects of *Ptychopetalum olacoides* in aversive and non-aversive learning paradigms. *J Ethnopharmacol* **12**: 449–457.
- D'Aquila PS, Collu M, Pani L, Gessa GL, Serra G. 1994. Antidepressant-like effect of selective D₁ receptor agonist in the behavioural despair animal model of depression. *Eur J Pharmacol* **262**: 107–111.
- D'Aquila PS, Collu M, Gessa GL, Serra G. 2000. The role of dopamine in the mechanism of action of antidepressant drugs. *Eur J Pharmacol* **405**: 365–373.
- De Montis MG, Gambarana C, Meloni D. 1993. Alpha-methyl-para-tyrosine antagonizes the effect of chronic imipramine on learned helplessness in rats. *Eur J Pharmacol* **249**: 179–183.
- Dunlop BW, Nemeroff CB. 2007. The role of dopamine in the pathophysiology of depression. *Arch Gen Psychiatry* **64**: 327–337.
- Elisabetsky E, Siqueira IR. 1998. Is there a psychopharmacological meaning for traditional tonics? In *Plants for Food and Medicine*, Prendergast HDV, Etkin NL, Harris DR, Houghton PJ (eds). Kew: Royal Botanical Gardens; 373–385.
- Gambarana C, Ghiglieri O, Tagliamonte A, Dalessandro N, De Montis MG. 1995. Crucial Role of D₁ dopamine receptor in mediating the antidepressant effect of imipramine. *Pharmacol Biochem Behav* **2**: 147–151.
- Golden RN, Markey SP, Risby ED, Cowdry RW, Potter WZ. 1988. Antidepressants reduce whole-body norepinephrine turnover while enhancing 6-hydroxymelatonin output. *Arch Gen Psychiatry* **45**: 150–154.

- Healy D. Did regulators fail over selective serotonin reuptake inhibitors? 2006. *BMJ* **333**: 92–95.
- Jain NN, Ohal CC, Shroff SK, Bhutada RH, Somani RS, Kasture VS, Kasture SB. 2003. Clitoria ternatea and the CNS. *Pharmacol Biochem Behav* **75**: 529–536.
- Mancinelli A, D'Aranno V, Stasi MA, Lecci A, Borsini F, Meli A. 1991. Effects of enantiomers of propranolol on desipramine-induced anti-immobility in the forced swimming test in the rat. *Pharmacol Res* **23**: 47–50.
- Miller HL, Ekstrom RD, Mason GA, Lydiard RB, Golden RN. 2001. Noradrenergic function and clinical outcome in antidepressant pharmacotherapy. *Neuropsychopharmacology* **24**: 617–23.
- Reis de Oliveria I, Diquet B, Van der Meersch V, Dardennes R, Gonidec J, do Prado-Lima PA. 1990. Self-inhibiting action of nortriptyline's anti-immobility effect at high plasma and brain levels in mice. *Psychopharmacology* **102**: 553–556.
- Renard CE, Fiocco AJ, Clenet F, Hascoet M, Bourin M. 2001. Is dopamine implicated in the antidepressant-like effects of selective serotonin reuptake inhibitors in the mouse forced swimming test? *Psychopharmacology* **159**: 42–50.
- Rodrigues AL, da Silva GL, Mateussi AS, Fernandes ES, Miguel OG, Yunes RA, Calixto JB, Santos AR. 2002. Involvement of monoaminergic system in the antidepressant-like effect of the hydroalcoholic extract of *Siphocampylus verticillatus*. *Life Sci* **70**: 1347–1358.
- Rojas-Corrales MO, Gibert-Rahola J, Mico JA. 1998. Tramadol induces antidepressant-type effects in mice. *Life Sci* **63**: 175–180.
- Sairam K, Dorababu M, Goel RK, Bhattacharya SK. 2002. Antidepressant activity of standardized extract of *Bacopa monniera* in experimental models of depression in rats. *Phytotherapy* **9**: 207–211.
- Siqueira IR, Lara DR, Silva D, Gaijeski FS, Nunes DS, Elisabetsky E. 1998. Psychopharmacological properties of *Ptychopetalum olacoides* BENTHAM (Olacaceae). *Pharm Biol* **36**: 327–334.
- Siqueira IR, Cimarosti H, Fochesatto C, Nunes DS, Salbego C, Elisabetsky E, Netto CA. 2004. Neuroprotective effects of *Ptychopetalum olacoides* Bentham (Olacaceae) on oxygen and glucose deprivation induced damage in rat hippocampal slices. *Life Sci* **75**: 1897–1906.
- Siqueira IR, Fochesatto C, Torres IL, da Silva AL, Nunes DS, Elisabetsky E, Netto CA. 2007. Antioxidant activities of the ethanol extract from *Ptychopetalum olacoides* in mice brain. *Phytotherapy* **14**: 763–769.
- Steru L, Chermat R, Thierry B, Simon P. 1985. The tail suspension test: a new method for screening antidepressant in mice. *Psychopharmacology* **85**: 367–370.
- Suhara TK, Nakayama O, Inoue HF, Shimizu AM, Tateno Y. 1992. D1 dopamine receptor-binding in mood disorders measured by positron emission tomography. *Psychopharmacology* **106**: 14–18.
- Sunal R, Gümüşel B, Kayaalp SO. 1994. Effect of changes in swimming area on results of 'Behavioural Despair Test'. *Pharmacol Biochem Behav* **49**: 891–896.
- Willner P. 1990. Animal models of depression: an overview. *Pharmacol Ther* **45**: 425–455.
- Wong Ma-Li, Licinio J. 2001. Research and treatment approaches to depression. *Nat Rev Neurosci* **2**: 343–351.
- Yamada J, Sugimoto Y, Yamada S. 2004. Involvement of dopamine receptors in the anti-immobility effects of dopamine re-uptake inhibitors in the forced swimming test. *Eur J Pharmacol* **504**: 207–211.
- Zomkowski AD, Rosa AO, Lin J, Santos AR, Calixto JB, Rodrigues AL. 2004. Evidence for serotonin receptor subtypes involvement in agmatine antidepressant like-effect in mouse forced swimming test. *Brain Res* **1023**: 253–263.

3.2. Ângelo L. Piato; Bernardo C. Detanico; Jennifer J. Freitas; Francisco L. Lhullier; Domingos S. Nunes; Elaine Elisabetsky. **Effects of Marapuama in the chronic mild stress model: further indication of antidepressant properties** (Artigo publicado no periódico *Journal of Ethnopharmacology* 2008 Jul 23; 118 (2):300-304).



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Ethnopharmacology

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

Effects of Marapuama in the chronic mild stress model: Further indication of antidepressant properties

Ângelo L. Piato^{a,b,*}, Bernardo C. Detanico^a, Jennifer F. Jesus^a,
Francisco Luiz Rodrigues Lhullier^d, Domingos S. Nunes^c, Elaine Elisabetsky^{a,b}

^a Laboratório de Etnofarmacologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Avenida Sarmento Leite 500/202, Porto Alegre, RS 90050-170, Brazil

^b Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Avenida Ipiranga 2752, Porto Alegre, RS 90610-000, Brazil

^c Departamento de Química, Universidade Estadual de Ponta Grossa, Campus Uvaranas, Bloco M, Ponta Grossa, PR 84030-310, Brazil

^d Faculdade de Farmácia, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Avenida Ipiranga 6681, Porto Alegre, RS 90619-000, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 11 December 2007

Received in revised form 13 March 2008

Accepted 19 April 2008

Available online 24 April 2008

Keywords:

Ptychopetalum olacoides

Marapuama

Muirapuama

Antidepressant

Unpredictable chronic mild stress

Corticosterone

ABSTRACT

Ethnopharmacology relevance: *Ptychopetalum olacoides* Bentham (PO) (Olacaceae), known as Marapuama, is regarded as a "nerve tonic" in the Amazon. Traditional uses include states of lassitude with noticeable lack of desire/motivation, and to manage particularly stressful (physical and/or psychological) circumstances. Suggestive of antidepressant activity, we have established that a specific PO ethanol extract (POEE) significantly decreases immobility in the tail suspension and forced swimming tests.

Aim of the study: The aim of this study was to verify the effects of POEE in the unpredictable chronic mild stress (UCMS) depression model in mice, given the construct and face values of the UCMS as an experimental model of depression and the traditional use of this species.

Materials and methods: Over 6 weeks BALB/c mice were subjected to the UCMS protocol. The effects of POEE (50, 100, 300 mg/kg, p.o.) and imipramine (20 mg/kg, i.p.) were evaluated in relation to coat state, splash-test grooming, and corticosterone levels.

Results: The coat state degradation, decreased grooming and increased serum corticosterone induced by UCMS were prevented by POEE and imipramine treatments.

Conclusion: In addition to supporting traditional claims and previously reported antidepressant properties for POEE, this study shows that POEE prevents stress-induced HPA hyperactivity.

© 2008 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Stress is involved in the pathogenesis of a variety of diseases, including hypertension, peptic ulcer, immuno-suppression, reproductive dysfunction and behavioral disorders (Gillespie and Nemeroff, 2005; Sapolsky et al., 2006). Stress is also considered of paramount importance in the genesis of depression (Barden, 2004), a prevalent condition with significant costs for the individual and society (Wong and Licinio, 2001). Accordingly, the function of the hypothalamic–pituitary–adrenal (HPA) axis has been found to be altered in depressed patients, with activity lev-

els returning to normal after antidepressant treatment with drugs or electroconvulsive therapy (Swiergiel et al., 2008). Hyperactivation of the HPA axis results in increased levels of corticotrophin releasing hormone (CRH), adrenocorticotrophic hormone (ACTH) and cortisol in the hypothalamus, pituitary and adrenal cortex, respectively.

Interestingly, the exposure of rodents to a schedule of unpredictable chronic mild stress (UCMS) induces behavioral changes that mimic symptoms of human depression, such as decreased consumption of palatable solution (interpreted as anhedonia) and degradation of the coat (Willner, 1997; Ducottet et al., 2003). Moreover, as in depressed patients, behavioral changes in rodents are reversed by antidepressants only after several weeks of treatment (Willner, 1997). The UCMS has been therefore considered as an experimental model of depression with good face, construct and predictive (responsive to chronic treatment with a variety of antidepressants) validities (Willner, 1997; Mineur et al., 2006). In terms of relevance to this study, the UCMS can be seen as the experimental

* Corresponding author at: Laboratório de Etnofarmacologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Avenida Sarmento Leite 500/202, Porto Alegre, RS 90050-170, Brazil. Tel.: +55 51 3308 3137; fax: +55 51 3308 3121.

E-mail address: angelopiato@gmail.com (Â.L. Piato).

model that is most analogous to the precipitation of depression by chronic, low-grade stress in humans.

Ptychopetalum olacoides Benth (PO) (Olacaceae), known as Marapuama, is used by Amazonian peoples to treat a syndrome known as “nerve weakness” (da Silva et al., 2007). The syndrome includes lassitude, a general lack of desire or motivation (as often revealingly described by users: “a man loses interest even for soccer and women”), tremors and sexual impotence as prominent symptoms; the species is also indicated to facilitate recovery from stroke, and used in particularly stressful (physical and/or psychological) circumstances (Siqueira et al., 1998). The plant material is usually prepared in cachaça (a distilled spirit obtained from sugar cane) or wine, and drunk daily before meals. Coherently with traditional claims, antidepressant (Piato et al., submitted), neuroprotective (Siqueira et al., 2004), antioxidant (Siqueira et al., 2007), and memory facilitating effects (da Silva et al., 2004, 2007) were identified with a standardized PO ethanol extract (POEE).

We have established that POEE (intraperitoneally or orally administered to mice) significantly and dose-dependently decreases immobility in the tail suspension and forced swimming tests, apparently through effects on D₁ dopamine and β -noradrenergic receptors (Piato et al., submitted). Considering the value of UCMS as an experimental model of depression, and the use of this plant species specifically in relation to stressful periods, the aim of this study was to verify the effects of POEE in the UCMS in mice.

2. Methods

2.1. Animals

Experiments were performed with 2 months old male BALB/c mice, obtained from Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (FEPPS). Mice were maintained in individual cages in a separate room with inverted 12 h-light/dark cycle (lights on at 20:00 h and off at 08:00 h), under controlled environmental conditions (22 ± 1 °C, with free access to food [Nuvilab CR1] and water) for at least 2 weeks before experiments; this is referred to as the non-stress period. All procedures were carried out in accordance with institutional policies on the handling of experimental animals (ethics committee approval # 2006543), which follow NIH guidelines (NIH Guide for Care and Use of Laboratory Animals, NIH publication no. 85–23, 1985).

2.2. Extract

Roots of *Ptychopetalum olacoides* Benth (Olacaceae) were collected near Capim River (Pará, Brazil), identified by Nelson Rosa (the voucher MPEG 108.036 is deposited at the Goeldi Museum herbarium) according to national guidelines associated with the United Nations Convention on Biodiversity. *Ptychopetalum olacoides* ethanol extract (POEE) was obtained as follows: dried ground roots (2.5 kg) were extracted with ethanol (12 l) in Soxhlet (40 h), and evaporated under reduced pressure (6% yield). POEE contains saponin, phenolic and terpenic compounds; HPLC fingerprinting was carried out on an HP 1100 system equipped with a photodiode array detector (Siqueira et al., 2003, 2007).

2.3. Drugs

Imipramine HCl was acquired from Sigma (USA) and dissolved in saline (NaCl 0.9%). POEE was dissolved in DMSO 20%.

2.4. Experimental groups and drug administration

At the end of 2 weeks of a drug-free stress exposure mice were assigned to different experimental groups so that body weights and coat state were comparable in all the groups. Imipramine (20 mg/kg) and saline were injected intraperitoneally (i.p.), whereas POEE (50, 100 and 300 mg/kg) and DMSO were given orally (p.o.); all drugs were given as 0.1 ml/10 g body weight.

2.5. Unpredictable chronic mild stress model

The UCMS protocol was based on Yalcin et al. (2005). Following the non-stress period, for 6 weeks mice were subjected a number of times a day to one of the following stressors: damp sawdust (90–180 min), three sawdust changes (30–60 min), sawdust free cage (90–180 min), sawdust free cage with 200 ml water (90–180 min), transfer to a new, clean cage, 45° cage tilting (90–180 min), 15 min of cat meowing, inversion of the light/dark cycle (for 48 h in a different room), and several 30 min periods of light during the dark phase. To prevent habituation and maintain the aspect of unpredictability, every week the timing of all stressors and stressor sequences was changed. The non-stress control group remained in the same room for a total of 8 weeks in cages holding 4–5 mice.

2.6. Coat state and body weight

During the non-stress period and 6 weeks of UCMS, the coat state and body weights were recorded every Monday. Coat state assessment was carried out by observers unaware of treatments, by scoring the coat at the head, neck, torso, forepaws, hindpaws, ventral and genital regions, and tail. A score of 0 for a coat in a good state or a score of 1 for a dirty coat were given for each of these areas (Ducottet and Belzung, 2004). Total score was obtained from the sum of the score of all body parts.

2.7. Splash test

The splash test is used as a direct measure of grooming and is here considered as an indirect measure of palatable solution intake. At the beginning of the 6th stress week, a 10% sucrose solution was splashed on the dorsal coat of mice in their home cage and animals were videotaped for 5 min (Ducottet and Belzung, 2004). Videos were independently analyzed by three observers unaware of the treatment, using the Observer-Noldus software (Netherlands) to record the frequency of grooming. Grooming bouts recorded included nose/face grooming (strokes along the snout), head washing (semicircular movements over the top of the head and behind the ears) and body grooming (body fur licking) (Kalueff and Tuohimaa, 2004).

2.8. Measurement of corticosterone

48 h after the splash test, mice were sacrificed by decapitation and blood samples collected. Samples were centrifuged at 4 °C and serum stored at –20 °C. Serum corticosterone was measured with the Immuchen™ ¹²⁵I Corticosterone Radioimmunoassay Kit (MP Biomedicals, LLC, Orangeburg, NY, USA) according to the manufacturer's instructions. The sensitivity of the measurement was 7.7 ng/ml. The intra- and inter-assay coefficients of variation were 7.1 and 9.5%, respectively.

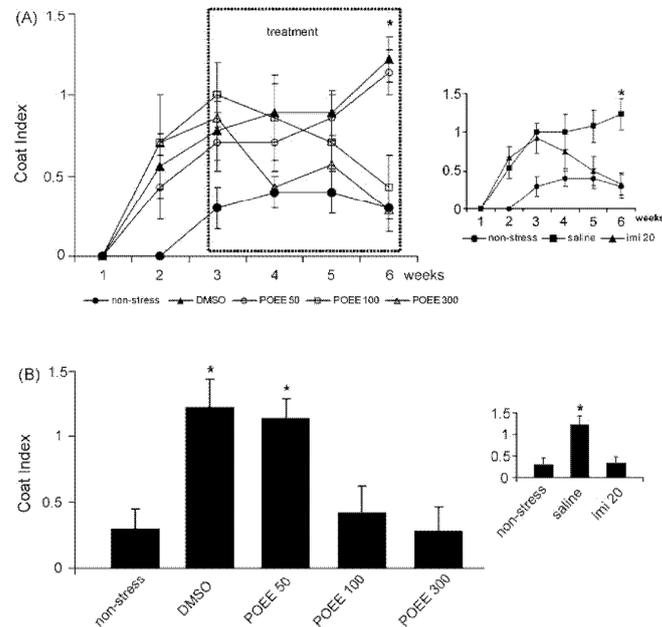


Fig. 1. Effects of EEPO and imipramine on the coat state of mice during (A) and at the end of (B) 6 weeks of UCMS. Means \pm S.E.M. of group coat scores. $N=8-10$. POEE (50, 100 and 300 mg/kg) and imipramine (imi, 20 mg/kg). * $P<0.05$ \times non-stress group. Kruskal–Wallis/Mann–Whitney.

2.9. Statistical analysis

Results are expressed as mean \pm S.E.M. The state of the coat and the frequency of grooming were compared by Kruskal–Wallis followed by Mann–Whitney U -test when significant differences were detected. The corticosterone levels were compared by ANOVA followed by Duncan's test. SPSS 10.0 for Windows was used for the statistical analysis. Significance was set at $P<0.05$.

3. Results

Fig. 1 shows scores obtained for coat state during the 6 weeks of UCMS (Fig. 1A), and at the end of the experiment (Fig. 1B). Kruskal–Wallis revealed significant treatment differences for POEE ($H=16.5$, $P<0.01$) and imipramine ($H=13.6$, $P<0.01$). Mann–Whitney confirmed that UCMS significantly ($P<0.05$ at 6th week) degraded the coat state as compared to the non-stress group and that imipramine (20 mg/kg) and POEE (100 and 300 mg/kg) significantly ($P<0.05$) prevented this degradation.

Results from the splash test are shown in Fig. 2. Kruskal–Wallis revealed significant treatment differences for POEE ($H=23.5$, $P<0.01$) and imipramine ($H=17.6$, $P<0.01$). Mann–Whitney confirmed that UCMS significantly ($P<0.01$) decreased grooming as compared to the non-stress group and that imipramine and POEE (100 and 300 mg/kg) prevented this decrease.

Analysis of corticosterone levels is shown in Fig. 3. The insert shows that corticosterone levels were significantly higher in mice submitted to UCMS ($F_{2,28}=4.8$, $P<0.05$), and that imipramine-treated mice maintained a level comparable to that of the non-stress group. Likewise, corticosterone levels of POEE (50, 100 and 300 mg/kg)-treated animals were comparable to those of the

non-stress group, whereas the UCMS significantly increased the corticosterone levels of DMSO ($F_{4,34}=4.3$, $P<0.01$).

No differences were found in body weight gain among the several treatments ($P>0.05$) (data not shown), with an average of 0.87 g/week over the 8 weeks.

4. Discussion

The HPA axis is vital for the physiological response to stress, and its sustained activation for extended periods has been associated with depression (Bisette et al., 2003). A number of depressed patients present increased cortisol secretion, accompanied by an abnormal 24-h secretory pattern resistant to suppression by exogenous steroids (Barden, 2004). In depressed patients with a malfunctioning HPA axis, changes in mood and hormones are temporally correlated when antidepressant pharmacotherapy is successful (Greden et al., 1983; Holsboer-Trachslers et al., 1991). Hence, the normalization of HPA axis activity has been suggested both as a marker of depression relief, and possibly as essential to the cure of depression.

As expected, the UCMS regimen used in this study induced degradation of the coat state, decreased grooming in the splash test, and increased serum corticosterone levels. Coat state degradation in mice is one of the most significant changes induced by UCMS and is understood as a consequence of decreased grooming. It has been suggested that decreases in grooming may be related to resource conservation in favor of coping behaviors towards the stressing situation (Ducottet and Belzung, 2004). Whereas the coat state indirectly evaluates grooming, the splash test is a direct observation of an induced grooming behavior (Santarelli et al., 2003). Since UCMS is associated with decreased consumption of palatable

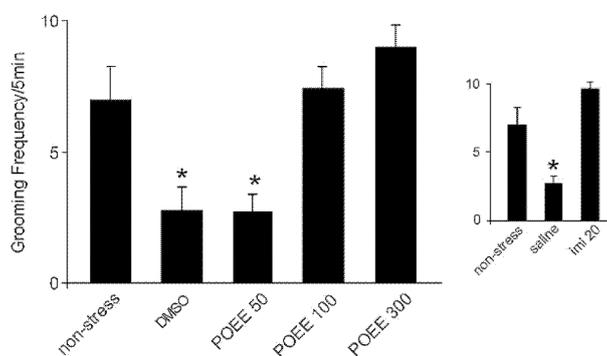


Fig. 2. Effects of POEE and imipramine in the splash test. POEE (50, 100 and 300 mg/kg) and imipramine (imi, 20 mg/kg). Means \pm S.E.M. of group grooming frequencies. $N=8-10$. * $P < 0.01$ \times non-stress group. Kruskal–Wallis/Mann–Whitney.

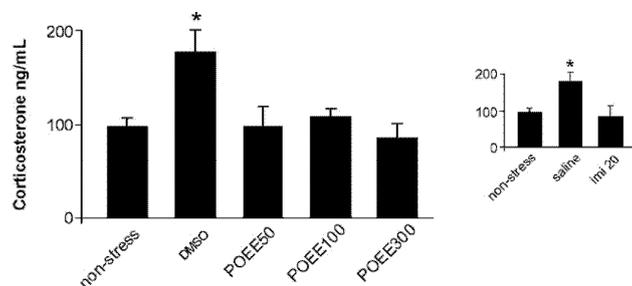


Fig. 3. Effects of POEE (50, 100 and 300 mg/kg) and imipramine (imi, 20 mg/kg) on corticosterone levels of mice submitted to UCMS. Means \pm S.E.M. $N=8-10$. * $P < 0.01$ \times non-stress group. ANOVA/Duncan.

solution (Willner et al., 1996), and in this case grooming is induced with splash sucrose solution, it is arguable that the frequency of grooming can also be seen as an indirect measure of sucrose solution consumption (Willner, 2005). Suppression of rewarded behavior by repeated stress is a reliable and reproducible phenomenon described in rats and mice (Papp et al., 1996; Willner, 1997).

Similar to imipramine, POEE treatment was found to prevent changes induced by UCMS in all studied parameters. Moreover, the data presented here strongly corroborate the antidepressant profile of this extract, suggested by its effects on the tail suspension and forced swim screening tests in mice (Piato et al., submitted), as well as the potentiation of the lethality of yohimbine and the reversal of reserpine-induced ptosis (Siqueira et al., 1998).

It has been shown that fluoxetine, desipramine, CRF1 antagonist and vasopressin V1b antagonist (Griebel et al., 2002a,b; Ducottet et al., 2003; Yalcin et al., 2005) are able to counteract the effects of UCMS on the state of the coat and/or the splash test. Although a clear picture of the action of antidepressants on the HPA axis is still lacking, a dual mechanism has been proposed (Barden, 2004), including a direct action on corticosteroid receptors and an indirect activation through an increased serotonergic/noradrenergic post-synaptic activation. It is likewise unclear how POEE affects the HPA axis, and measurements of ACTH and CRF levels is warranted to obtain a clear understanding of this issue. The pharmacodynamic basis of the purported antidepressant properties of this extract is also only partially known at this point. The mechanism of action of POEE appears to involve D_1 dopamine and β -noradrenergic

receptors, since SCH23390 and propranolol reverse POEE effects on both the tail suspension and forced swimming tests (Piato et al., submitted). There is evidence that both noradrenergic (Sherman and Petty, 1980) and dopaminergic neurotransmission (Harvey et al., 2005; Dronjak and Gavrilovic, 2006) may be altered by stress in certain brain areas, including the hippocampus. While additional evidence is required to elucidate the role of the hippocampus in adaptation to stress, an attenuation of the stress-induced aversive state and consequent emotional impact has been suggested (Tsankova et al., 2006). The relevance of the hippocampal formation in stress and depression is furthermore indicated by its high concentration of corticoid receptors, as well as the plastic modifications known to occur in the hippocampus after both stress (Joca et al., 2007) and depression (Pittenger and Duman, 2008).

It is noteworthy that *Ptychopetalum olacoides*' traditional therapeutic indications include "periods of physical and/or psychological stress". In addition to supporting traditional claims and previously reported antidepressant-like properties for POEE, this study suggests that POEE may prevent HPA hyperactivity induced by chronic stress.

Acknowledgements

This study is associated with patents PI0205432-9/PI0307647-4 (INPI/Br). This research was supported by the FINEP research grant "Rede Instituto Brasileiro de Neurociência (IBN-Net)" # 01.06.0842-00 and CNPq fellowships to authors.

References

- Barden, N., 2004. Implication of the hypothalamic–pituitary–adrenal axis in the physiopathology of depression. *Journal of Psychiatry & Neuroscience* 29, 185–193.
- Bissette, G., Klimek, V., Pan, J., Stockmeier, C., Ordway, G., 2003. Elevated concentrations of CRF in the locus coeruleus of depressed subjects. *Neuropsychopharmacology* 28, 1328–1335.
- da Silva, A.L., Piato, A.L., Bardini, S., Netto, C.A., Nunes, D.S., Elisabetsky, E., 2004. Memory retrieval improvement by *Ptychopetalum olacoides* in young and aging mice. *Journal of Ethnopharmacology* 95, 199–203.
- da Silva, A.L., Piato, A.L., Ferreira, J.G., Martins, B.S., Nunes, D.S., Elisabetsky, E., 2007. Promnesic effects of *Ptychopetalum olacoides* in aversive and non-aversive learning paradigms. *Journal of Ethnopharmacology* 109, 449–457.
- Dronjak, S., Gavrilovic, L., 2006. Effects of stress on catecholamine stores in central and peripheral tissues of long-term socially isolated rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 39, 785–790.
- Ducotet, C., Griebel, G., Belzung, C., 2003. Effects of the selective nonpeptide corticotropin-releasing factor receptor 1 antagonist antalarmin in the chronic mild stress model of depression in mice. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry* 7, 625–631.
- Ducotet, C., Belzung, C., 2004. Behaviour in the elevated plus-maze predicts coping after subchronic mild stress in mice. *Physiology & Behavior* 81, 417–426.
- Gillespie, C.F., Nemeroff, C.B., 2005. Hypercortisolemia and depression. *Psychosomatic Medicine* 67, S26–S28.
- Greden, J.F., Gardner, R., King, D., Grunhaus, L., Carroll, B.J., Kronfol, Z., 1983. Dexamethasone suppression tests in antidepressant treatment of melancholia. The process of normalization and test-retest reproducibility. *Archives of General Psychiatry* 40, 493–500.
- Griebel, G., Simiand, J., Serradeil-Le Gal, C., Wagnon, J., Pascal, M., Scatton, B., Maffrand, J.P., Soubrie, P., 2002a. 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 of the United States of America* 99 (9), 6370–6375.
- Griebel, G., Simiand, J., Steinberg, R., Jung, M., Gully, D., Roger, P., Geslin, M., Scatton, B., Maffrand, J.P., Soubrie, P., 2002b. 4-(2-Chloro-4-methoxy-5-methylphenyl)-N-[(1S)-2-cyclopropyl-1-(3-fluoro-4-methylphenyl)ethyl]5-methyl-N-(2-propynyl)-1, 3-thiazol-2-amine hydrochloride (SSR125543A), a potent and selective corticotropin-releasing factor(1) receptor antagonist. II. Characterization in rodent models of stress-related disorders. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 301, 333–345.
- Harvey, B.H., Bothma, T., Nel, A., Wegener, G., Stein, D.J., 2005. Involvement of the NMDA receptor, NO-cyclic GMP and nuclear factor K-beta in an animal model of repeated trauma. *Human Psychopharmacology* 20, 367–373.
- Holsboer-Trachsler, E., Stohler, R., Hatzinger, M., 1991. Repeated administration of the combined dexamethasone-human corticotropin releasing hormone stimulation test during treatment of depression. *Psychiatry Research* 38, 163–171.
- Joca, S.R., Ferreira, F.R., Guimarães, F.S., 2007. Modulation of stress consequences by hippocampal monoaminergic, glutamatergic and nitergic neurotransmitter systems. *Stress* 10, 227–249.
- Kalueff, A.V., Tuohimaa, P., 2004. Grooming analysis algorithm for neurobehavioural stress research. *Brain Research Protocols* 13, 151–158.
- Mineur, Y.S., Belzung, C., Crusio, W.E., 2006. Effects of unpredictable chronic mild stress on anxiety and depression-like behavior in mice. *Behavioural Brain Research* 175, 43–50.
- Papp, M., Moryl, E., Willner, P., 1996. Pharmacological validation of the chronic mild stress model of depression. *European Journal of Pharmacology* 296, 129–136.
- Antidepressant profile of *Ptychopetalum olacoides* Bentham (Marapuama) in mice, submitted. *Phytotherapy Research*.
- Pittenger, C., Duman, R.S., 2008. Stress, depression, and neuroplasticity: a convergence of mechanisms. *Neuropsychopharmacology* 33, 88–109.
- Santarelli, L., Saxe, M., Gross, C., Surget, A., Battaglia, F., Dulawa, S., Weisstaub, N., Lee, J., Duman, R., Arancio, O., Belzung, C., Hen, R., 2003. Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants. *Science* 301, 805–809.
- Sapolsky, R.M., Romero, L.M., Munck, A.U., 2006. How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. *Endocrine Reviews* 21, 55–89.
- Sherman, A., Petty, F., 1980. Neurochemical basis of the action of antidepressants on learned helplessness. *Behavioral and Neural Biology* 30, 119–134.
- Siqueira, I.R., Lara, D.R., Silva, D., Gaijeski, F.S., Nunes, D.S., Elisabetsky, E., 1998. Psychopharmacological properties of *Ptychopetalum olacoides* BENTHAM (Olacaceae). *Pharmaceutical Biology* 36, 327–334.
- Siqueira, I.R., Fochesatto, C., da Silva, A.L., Nunes, D.S., Battastini, A.M., Netto, C.A., Elisabetsky, E., 2003. *Ptychopetalum olacoides*, a traditional Amazonian “nerve tonic”, possesses anticholinesterase activity. *Pharmacology, biochemistry, and behavior* 75 (3), 645–650.
- Siqueira, I.R., Cimarosti, H., Fochesatto, C., Nunes, D.S., Salbego, C., Elisabetsky, E., Netto, C.A., 2004. Neuroprotective effects of *Ptychopetalum olacoides* Bentham (Olacaceae) on oxygen and glucose deprivation induced damage in rat hippocampal slices. *Life Sciences* 75, 1897–1906.
- Siqueira, I.R., Fochesatto, C., Torres, I.L., da Silva, A.L., Nunes, D.S., Elisabetsky, E., Netto, C.A., 2007. Antioxidant activities of *Ptychopetalum olacoides* (“muita-pauma”) in mice brain. *Phytomedicine* 14, 763–769.
- Swiergiel, A.H., Leskov, I.L., Dunn, A.J., 2008. Effects of chronic and acute stressors and CRF on depression-like behavior in mice. *Behavioural Brain Research* 186, 32–40.
- Tsankova, N.M., Berton, O., Renthal, W., Kumar, A., Neve, R.L., Nestler, E.J., 2006. Sustained hippocampal chromatin regulation in a mouse model of depression and antidepressant action. *Nature Neuroscience* 9, 519–525.
- Willner, P., Moreau, J.L., Nielsen, C.K., Papp, M., Sluzewska, A., 1996. Decreased hedonic responsiveness following chronic mild stress is not secondary to loss of body weight. *Physiology & Behavior* 60, 129–134.
- Willner, P., 1997. Validity, reliability and utility of the chronic mild stress model of depression: a 10-year review and evaluation. *Psychopharmacology (Berl)* 34, 319–329.
- Willner, P., 2005. Chronic mild stress (CMS) revisited: consistency and behavioural-neurobiological concordance in the effects of CMS. *Neuropsychobiology* 52, 90–110.
- Wong, Ma-Li, Licinio, J., 2001. Research and treatment approaches to depression. *Nature Reviews. Neuroscience* 2, 343–351.
- Yalcin, I., Aksu, F., Belzung, C., 2005. Effects of desipramine and tramadol in a chronic mild stress model in mice are altered by yohimbine but not by pindolol. *European Journal of Pharmacology* 514, 165–174.

3.3. Ângelo L. Piato; Bernardo C. Detanico; Viviane M. Linck; Ana P. Herrmann; Domingos S. Nunes; Elaine Elisabetsky. **ANTI-STRESS EFFECTS OF THE “TONIC” MARAPUAMA IN MICE** (Artigo submetido ao periódico *Phytomedicine*).

ANTI-STRESS EFFECTS OF THE “TONIC” MARAPUAMA IN MICE.

A.L. Piato^{a,b}, B.C. Detanico^a, V.M. Linck^a, A.P. Herrmann^a, D.S. Nunes^c and E. Elisabetsky^{a,b*}.

^aLaboratório de Etnofarmacologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde; ^bPrograma de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

^cDepartamento de Química, Universidade Estadual de Ponta Grossa, Campus Uvaranas, Ponta Grossa, PR, Brazil.

*Corresponding author: Elaine Elisabetsky, elaine.elisabetsky@gmail.com

Phone: 55 51 3308-3569, Fax: 55 51 3308-3121.

Abstract

With the recognition that high levels of sustained stress are associated with the natural course of countless illnesses, effective anti-stress agents have gained importance. Improved endurance to particularly stressful periods is one of the medicinal claims for Marapuama (*Ptychopetalum olacoides* Bentham, PO), a popular Amazonian herbal. The purpose of this study was to evaluate if PO possesses anti-stress properties. To this end, an extract from PO (POEE) was evaluated on anxiety and glucose levels in mice submitted to the unpredictable chronic mild stress (UCMS) paradigm. POEE did not present anxiolytic effects, but was able to prevent ($p < 0.01$) the UCMS-induced anxiety as assessed by the light/dark test (time spent in the lit area, POEE 100 and 300 mg/kg 235.9 ± 20.6 s and 250.4 ± 17.4 s, respectively, compared to DMSO 104.7 ± 24.4 s). Likewise, although POEE did not induce noticeable effects on glycemia, it effectively ($p < 0.01$) prevented the UCMS-induced hyperglycemia (POEE 100 and 300 mg/kg 106.4 ± 6.7 mg/dl and 107.3 ± 3.3 mg/dl, respectively, compared to DMSO 134.6 ± 5.9 mg/dl). Additionally, POEE (50-200 mg/kg i.p. and 800 mg/kg p.o.) significantly ($p < 0.01$ and $p < 0.05$, respectively) increased the time to hypoxia-induced convulsion (by 38%, 51%, 59% and 27%, respectively for i.p. and p.o. treatments). The data indicate that POEE counteracts some of the effects brought about by chronic stress. This study combined with the identified antioxidant and neuroprotective properties, as well as the claimed benefits associated with stressful periods suggest that Marapuama might possess adaptogen-like properties.

Introduction

In Brazil “tonics” are used in order to increase physical endurance, ameliorate performance in mental tasks, improve memory, or are even indicated for periods of convalescence from debilitating diseases or sudden weight loss. While tonics may be similar to fortifiers, energizers, or restoratives (Mendes and Carlini, 2007), some are regarded as having specific qualities, such as for instance “sexual tonics”. Although tonics may be used in a vitamin-like fashion simply to ensure “good health”, some are rather used as stimulants (e.g, “rebite”, “arrebite”, popular amongst truck drivers), some are clearly meant to improve physical and mental performance (being popular in the fitness center scenario and amongst students, respectively), while others are used in association with periods of illness, either to help convalescence or to minimize the harsh effects of remedies (popular amongst older people) (Elisabetsky and Siqueira, 1998). Examples of plants traditionally used as “tonics” in Brazil include *Heteropterys aphrodisiaca* (Malpighiaceae), *Paullinia cupana* (Sapindaceae), and *Mauritia flexuosa* (Araceae) (for review see Mendes and Carlini, 2007).

Based on the original ideas of Lazarev (1947), Wagner and colleagues defined adaptogens as “substances which elicit in an organism a state of non-specifically raised resistance allowing them to counteract stressor signals and to adapt to exceptional strain” (Wagner et al., 1994). More recently, adaptogens have been defined as “natural metabolic regulators that increase the ability of the organism to adapt to environmental factors and to avoid damage from such factors” (Panossian et al., 1999a). A revised and expanded interpretation of the concept and associated therapeutic outcomes has been thoroughly discussed (Olalde Rangel, 2005a,b,c). The general purposes of a treatment with adaptogens include to decrease reactivity to stress, to diminish stress triggered reactions (alarm phase of the stress response), and to prevent or at least delay the state of exhaustion (conferring protection against long-term stress) (Panossian et al., 1999a). The mode of action of adaptogens is not completely understood, but the modulation of catecholamines and other stress mediators (e.g., cortisol and nitric oxide) has been proposed (Panossian et al., 1999b). In addition, antioxidant, immunomodulator, hypoglycemic, hypocholesterolemic, and other non-specific

properties may be involved in the overall adaptogenic effect (Panossian et al., 1999c; Rege et al., 1999; Davydov and Krikorian, 2000).

Ptychopetalum olacoides Bentham (PO) (Olacaceae), known as Marapuama in Brazil and Muirapuama in other South American countries, is found in medicinal plant markets or as herbals in diverse formulations, usually sold to increase physical, mental and/or sexual performance. In the Amazon, where its use originates, Marapuama is especially used by the elderly to treat a condition recognized as “nerve weakness” (Elisabetsky and Siqueira, 1998). The syndrome includes lassitude, a general lack of desire or motivation, tremors and sexual impotence as prominent symptoms (Siqueira et al., 1998). The species is also used by anyone (regardless of age) for enduring periods of high physical (such as gold miners) or mental (such as students in test periods) demand. The roots are usually prepared in “*cachaça*” (the national distilled spirit obtained from sugar cane) or wine, and drunk daily before meals. We have shown that a standardized ethanol extract of *P. olacoides* (POEE) is promnesic (da Silva et al., 2004, 2007) counteracts several types of amnesia (da Silva et al., 2008), and has neuroprotective (Siqueira et al., 2004), antioxidant (Siqueira et al., 2007), and antidepressant properties (Piato et al., 2008a,b).

Given the traditional uses of PO, the antidepressant effects identified for POEE, and the relationship between stress and depression (Sapolsky et al., 2000), the present study aimed to evaluate whether POEE counteracts stress-induced effects. To this end, we evaluated the effects of POEE on anxiety and glucose levels in mice submitted to chronic mild stress. Additionally, POEE was evaluated in relation to mice endurance against hypoxia.

Materials and Methods

Animals

Two months old male CF1 mice (40-50 g) were used for hypoxia, glycemia and light/dark experiments with acute treatments. BALB/c male mice with two months of age (25-35 g) were used for the unpredictable chronic mild stress (UCMS). Mice were obtained from Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (FEPPS), and housed in our own animal facility (22 ± 1 °C, 12 hr-light-dark cycle, free access to

food [Nuvilab CR1] and water) for at least two weeks before experiments (non stress period). The project was approved by the University ethics committee (approval # 2006543).

Extract

Roots of *Ptychopetalum olacoides* Bentham (Olacaceae) were collected near Capim River (Pará, Brazil), and identified by Nelson Rosa (voucher MPEG n° 108.036, Goeldi Museum). Ground *P. olacoides* roots (2.5 kg) were extracted with ethanol (12 L) in Soxhlet (40 h), and evaporated under reduced pressure (6% yield of POEE). HPLC fingerprinting was carried out on a HP 1100 system equipped with a photodiode array detector (Agilent Technologies) (Siqueira et al., 2007).

Drugs

Imipramine HCl and diazepam were acquired from Sigma (USA) and dissolved in saline (0.9% NaCl) and propylene glycol (20% PPG), respectively. POEE was dissolved in 20% DMSO. All drugs were given as 0.1 ml/10 g body weight. The doses used for positive controls were selected from the studies on which the methodologies were based.

Unpredictable chronic mild stress model

The UCMS protocol was based on Yalcin et al. (2005), except that in this study anxiety rather than depression related parameters were assessed (Mineur et al, 2006). At the end of a two-week non stress, drug-free period, mice were assigned to different experimental groups in a semi-randomized fashion, so that mean body weights were comparable in all groups. From this point on, mice assigned to experimental groups were maintained in individual cages and on an inverted light-dark cycle; a non stress control group remained in the same room, housed 4-5 mice/cage, and was not submitted to stressors. Following the two-week non stress period, for 6 weeks mice were subjected several times a day to one of the following stressors: damp sawdust (90-180 min), 3 sawdust changes (30-60 min), sawdust-free cage (90-180 min), sawdust-free cage with 200 ml water (90-180 min), social stress, transfer to a new, clean cage, 45° cage tilting (90-180 min), 15 min of cat meowing, inversion of the light-dark cycle (for 48 h in a different room), and several 30 min periods of light during the dark phase. To prevent habituation and maintain the aspect of

unpredictability, the timing of all stressors and stressor sequences was changed weekly. After two weeks of stress, drugs were given daily for the remaining 4 weeks. Imipramine was used as control in order to differentiate antidepressant from anti-stress effects. Imipramine (20 mg/kg) and saline were injected intraperitoneally (i.p.), whereas POEE (50, 100 and 300 mg/kg) and DMSO were given orally (p.o.). All drugs were given as 0.1 ml/10 g body weight.

Light/dark

48 h after the end of the UCMS and 24 h after the last drug administrations, mice were submitted to the light/dark procedure (Li and Quock, 2001). The apparatus consisted of a rectangular wood box (46x27x30 cm), divided into one small (18x27 cm) and one large (27x27 cm) areas, with a door-like opening (7.5x7.5 cm) in the center of the separation. The small compartment was painted in black and light-free, whereas the large one was white and brightly lit with two 60 W cold light sources. Each animal was individually placed in the center of the bright compartment (facing away from the door) and the following parameters were noted for 5 min: latency to the first crossing from one compartment to the other, time spent in the light compartment and the number of crossings between the light and dark compartments. The test was performed in a quiet and darkened room (red bulb), and mice were kept in this room for at least 1 h before the session. In order to check if POEE shows anxiolytic properties independent of previous stress, additional experiments were done after acute treatments. To allow comparison with literature and previous data of our group, CF1 (instead of BALB/c) mice were used. Groups of mice (n = 8) were treated once intraperitoneally with saline, 20% PPG, diazepam 1 mg/kg, imipramine 20 mg/kg, or orally with 20% DMSO, POEE 50, 100 and 300 mg/kg; after 30 min (i.p.) or 90 min (p.o.) animals were placed in the light/dark box.

Glycemia

Glucose measurements were taken 72 h after the end of the UCMS, using a commercial glucometer tape (Accu-Chek Active® Roche), with a blood drop drawn from the tail. Measurements were taken between 13:00 h and 14:00 h, after 5 hours of fasting (food and water). To verify if POEE had an effect *per se* on glycemia, groups of mice (n = 8) were treated once with saline, imipramine 20 mg/kg (i.p.), 20% DMSO

or POEE 50, 100 and 300 mg/kg (p.o.); blood samples were collected after 30 min (i.p.) or 90 min (p.o.).

Endurance to Hypoxia

The method was based on Caillard et al. (1975). Animals received saline, 20% DMSO, POEE 50, 100 and 200 mg/kg (i.p.) or POEE 400 and 800 mg/kg (p.o.). After 30 min (i.p.) or 90 min (p.o.), the endurance to hypoxia was determined by placing mice individually in air-tight jars (300 ml). Endurance to hypoxia was defined as the latency to onset of convulsions, recorded with stop watches.

Statistical analysis

Results are expressed as mean \pm S.E.M. Data were analyzed by one-way ANOVA followed by Duncan post hoc. SPSS 11.0 for Windows was used for the statistical analysis. Significance was set at $p < 0.05$.

Results

As expected, the UCMS protocol was anxiogenic, with mice spending nearly 50% less time in the lit compartment in comparison to the non stress group ($F_{6,57} = 49.6$, $p < 0.01$, Fig. 1A). Treatment with POEE 100 and 300 mg/kg (but not 50 mg/kg) prevented the increase in anxiety. DMSO and imipramine were devoid of effects. No differences were observed regarding number of crossings ($F_{6,57} = 1.0$, $p > 0.05$) or latency to first crossing ($F_{6,57} = 0.7$, $p > 0.05$) (data not shown). Fig. 1B shows that only acute diazepam significantly altered the time spent in the lit compartment ($F_{7,63} = 13.8$, $p < 0.01$). As with the UCMS, no differences were noted regarding the other parameters ($F_{7,63} = 1.1$ $p > 0.05$ for number of crossings, $F_{7,63} = 0.7$, $p > 0.05$ for latency to first crossing).

Glycemia levels were significantly higher in mice submitted to UCMS ($F_{6,59} = 6.4$, $p < 0.01$, Fig. 2A). Glycemia levels of animals treated with POEE 100 and 300 mg/kg (but not POEE 50 mg/kg, or imipramine) were comparable to those of the non stress group. No differences were noted in the glycemia of acutely treated animals ($F_{5,47} = 0.2$, $p > 0.05$, Fig. 2B).

Endurance to hypoxia was significantly increased (38-59%) by POEE at all three i.p. doses ($F_{4,28} = 10.9$, $p < 0.01$, Fig. 3A), and the highest oral dose of POEE (26.7% increase, $F_{3,23} = 3.7$, $p < 0.05$, Fig. 3B).

Discussion

It is widely accepted that stress contributes to the pathogenesis of a variety of diseases, including psychiatric disorders. A clear relationship with stress has been established for endocrine disorders (including diabetes), immunosuppression, sexual and cognitive dysfunctions, peptic ulcer, hypertension and heart diseases, ulcerative colitis, anxiety, and depression (Sapolsky et al., 2000; Chandola et al., 2008). The response to acute stress is adaptive (allostasis), and appears to have restricted harmful effects since an array of physiological, biochemical and endocrine responses are set in motion to maintain homeostasis (Tsigos and Chrousos, 2002; McEwen, 2008). Nevertheless, sustained chronic stress appears to induce the syndrome described by Selye in 1936, a state of exhaustion leading to deregulation of stress mediators and pathologies (McEwen, 2008). For instance, high levels of stress have been shown to be associated with hippocampus and prefrontal cortex neuronal atrophy (with consequences for memory and executive function) (McEwen, 2008), as well as amygdala hypertrophy (associated with fear, anxiety, aggression, and first depressive episode) (Frodl et al., 2003).

We here show that POEE, although devoid of acute anxiolytic effect, was able to prevent chronic stress-induced anxiety (light/dark). Likewise, although POEE did not have a noticeable effect on glycemia, it effectively prevented the chronic stress-induced hyperglycemia. Moreover, POEE significantly increased mice endurance to hypoxia across a range of doses, given i.p. or orally. Overall, the data indicate that POEE is useful to counteract some deleterious effects of chronic stress; in other words, it can be argued that POEE possesses an adaptogen-like profile.

A series of stress models has been used to investigate the physiological consequences of stress and/or evaluate anti-stress agents. Unfortunately, however, the literature lacks standardized and well characterized assessment paradigms. The most frequently used animal protocols are swimming endurance (Singh et al., 2001; Kannur

et al., 2006), hypoxia (Singh et al., 2001), immobilization (Singh et al., 2001; Siripurapu et al., 2005), cold stress (Kannur et al., 2006) and chronic stress (Siripurapu et al., 2005; Bhattacharya and Muruganandam, 2003; Rai et al., 2003a; Singh et al., 2005). Animals exposed to chronic stress present behavioral changes associated with depression and anxiety (Mineur et al., 2006), as well as increased serum corticosterone (Ibarguen-Vargas et al., 2008) and glucose (Rai et al., 2003a). The reduction of UCMS-induced hyperglycemia by POEE treatment is similar to that reported for other adaptogen plants such as *Panax ginseng* (Rai et al., 2003b) and *Withania somnifera* (Bhattacharya and Muruganandam, 2003). Although the mechanism by which adaptogens prevent hyperglycemia is not clear, cortisol is known to enhance liver gluconeogenesis and reduce cellular glucose uptake (Surwit and Schneider, 1993). We have previously reported that POEE treatment prevents the UCMS-induced increase in corticosterone in mice (Piato et al., 2008a).

When mice are exposed to a hypoxic environment, brain noradrenaline is significantly decreased (Georgiev et al., 1995), and a state of oxidative stress is established (Morin et al., 2001). POEE-induced resistance to hypoxia may therefore be at least partially explained by its capacity to potentiate noradrenergic activity by beta receptors (Siqueira et al., 1998; Piato et al., 2008b), combined with its antioxidant properties (Siqueira et al., 2007). The data here reported are consistent with the neuroprotective effects of POEE found with hippocampal slices submitted to oxygen and glucose deprivation (Siqueira et al., 2004).

Stress management is not an easily accomplished task (see <http://www.isma.org.uk>). Although benzodiazepines have significant anti-stress activity in acute animal models of stress (Calil and Marcondes, 2006; Singh and Kumar, 2008), long-term use of low to moderate therapeutic doses is more often than not associated with dependence (Allison and Pratt, 2003). Benzodiazepine withdrawal syndrome and increased risk of accidents due to motor impairment are limitations to their continued use (Haro et al., 2003). Chronic treatment with adaptogens appears to have a stress-protective effect and to lead to a long-lasting state of non-specific resistance, resulting from adaptive changes of the organism (Panossian and Wagner,

2005). Further experiments are necessary to typify POEE as an adaptogen, and evaluate its benefits in stress management strategies.

Acknowledgements

This study is associated with patents PI0205432-9/PI0307647-4 (INPI/Br). The authors are grateful for fellowships received from CNPq.

References

Allison, C., Pratt, J.A., 2003. Neuroadaptive processes in GABAergic and glutamatergic systems in benzodiazepine dependence. *Pharmacol. Ther.* 98, 171-195.

Bhattacharya, S.K., Muruganandam, A.V., 2003. Adaptogenic activity of *Withania somnifera*: an experimental study using a rat model of chronic stress. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 75, 547-555.

Caillard, C., Menu, A., Plotkine, M., Rassinol, P., 1975. Do anti-convulsivant drugs exert protective effect against hypoxia? *Life Sci.* 16, 1607-1611.

Calil, C.M., Marcondes, F.K., 2006. The comparison of immobility time in experimental rat swimming models. *Life Sci.* 79, 1712-1719.

Chandola, T., Britton, A., Brunner, E., Hemingway, H., Malik, M., Kumari, M., Badrick, E., Kivimaki, M., Marmot, M., 2008. Work stress and coronary heart disease: what are the mechanisms? *Eur. Heart. J.* 29, 640-648.

da Silva AL, Ferreira JG, da Silva Martins B, Oliveira S, Mai N, Nunes DS, Elisabetsky E, 2008. Serotonin receptors contribute to the promnesic effects of *P. olacoides* (Marapuama). *Physiol. Behav.* 95:88-92.

da Silva, A.L., Piato, A.L., Bardini, S., Netto, C.A., Nunes, D.S., Elisabetsky, E, 2004. Memory retrieval improvement by *Ptychopetalum olacoides* in young and aging mice. *J. Ethnopharmacol.* 95:199-203.

da Silva, A.L., Piato, A.L., Ferreira, J.G., Martins, B.S., Nunes, D.S., Elisabetsky, E., 2007. Promnesic effects of *Ptychopetalum olacoides* in aversive and non-aversive learning paradigms. *J. Ethnopharmacol.* 109:449-457.

Davydov, M., Krikorian, A.D., 2000. *Eleutherococcus senticosus* (Rupr. & Maxim.) Maxim. (Araliaceae) as an adaptogen: a closer look. *J. Ethnopharmacol.* 72, 345-393.

Elisabetsky E, Siqueira I.R., 1998. Is there a psychopharmacological meaning for traditional tonics? *Plants for Food and Medicine*, Prendergast HDV, Etkin NL, Harris DR, Houghton PJ (ed). Kew: Royal Botanical Gardens.

Frodl, T., Meisenzahl, E. M., Zetsche, T., Born, C., Jager, M., Groll, C., Bottlender, R., Leinsinger, G., Moller, H. J., 2003. Larger amygdala volumes in first depressive episode as compared to recurrent major depression and healthy control subjects. *Biol. Psychiatry* 53, 338-344.

Georgiev, V., Stancheva, S., Getova, D., Alova, L., Opitz, M., 1995. Effects of angiotensin II on brain monoamines in nonhypoxic and hypoxic mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 50, 457-461.

Haro, G., Cervera, G., Martinez-Raga, J., Perez-Galvez, B., Fernandez-Garces, M., Sanjuan, J., 2003. Pharmacological treatment of substance dependence from a neuroscientific perspective (II): alcohol, benzodiazepines and nicotine. *Actas Esp. Psiquiatr.* 31, 284-298.

Ibarguen-Vargas, Y., Surget, A., Touma, C., Palme, R., Belzung, C., 2008. Multifaceted strain-specific effects in a mouse model of depression and of antidepressant reversal. *Psychoneuroendocrinology* 33:1357-68.

Kannur, D.M., Hukkeri, V.I., Akki, K.S., 2006. Adaptogenic activity of *Caesalpinia bonduc* seed extracts in rats. *J. Ethnopharmacol.* 108, 327-331.

Lazarev, N.V., 1947. 7th All-Union Congr. *Physiol., Biochem., Pharmacol.*; Medgiz, Moskau.

- Li, S., Quock, R.M., 2001. Comparison of N₂O- and chlordiazepoxide-induced behaviors in the light/dark exploration test. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 68:789-796.
- McEwen, B. S., 2008. Central effects of stress hormones in health and disease: Understanding the protective and damaging effects of stress and stress mediators. *Eur. J. Pharmacol.* 583, 174-185.
- Mendes, F.R., Carlini, E.A., 2007. Brazilian plants as possible adaptogens: an ethnopharmacological survey of books edited in Brazil. *J. Ethnopharmacol.* 109, 493-500.
- Mineur, Y.S., Belzung, C., Crusio, W.E., 2006. Effects of unpredictable chronic mild stress on anxiety and depression-like behavior in mice. *Behav. Brain Res.* 175, 43-50.
- Morin, D., Hauet, T., Spedding, M., Tillement, J., 2001. Mitochondria as target for antiischemic drugs. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 49:151-74.
- Olalde Rangel, J.A., 2005. The Systemic Theory of Living Systems and Relevance to CAM: Part I: The Theory (part I). *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* 2, 13-18.
- Olalde Rangel, J.A., 2005. The Systemic Theory of Living Systems and Relevance to CAM: The Theory (Part II). *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* 2, 129-137.
- Olalde Rangel, J.A., 2005. The Systemic Theory of Living Systems and Relevance to CAM: The Theory (Part III). *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* 2, 267-75.
- Panossian, A., Wikman, G., Wagner, H., 1999a. Plant adaptogens III. Earlier and more recent aspects and concepts on their mode of action. *Phytomedicine* 6, 287-300.
- Panossian, A. G., Oganessian, A. S., Ambartsumian, M., Gabrielian, E. S., Wagner, H., Wikman, G., 1999b. Effects of heavy physical exercise and adaptogens on nitric oxide content in human saliva. *Phytomedicine* 6, 17-26.

Panossian, A., Gabrielian, E., Wagner, H., 1999c. On the mechanism of action of plant adaptogens with particular reference to cucurbitacin R diglucoside. *Phytomedicine* 6, 147-155.

Panossian, A., Wagner, H., 2005. Stimulating effect of adaptogens: an overview with particular reference to their efficacy following single dose administration. *Phytother. Res.* 19, 819-838.

Piato, A.L., Detanico, B.C., Jesus, J.F., Lhullier, F.L., Nunes, D.S., Elisabetsky, E., 2008a. Effects of Marapuama in the chronic mild stress model: Further indication of antidepressant properties. *J. Ethnopharmacol.* 118, 300-304.

Piato, A.L., Rizon, L.P., Martins, B.S., Nunes, D.S., Elisabetsky, E., 2008b. Antidepressant profile of *Ptychopetalum olacoides* Benth (Marapuama) in mice. *Phytother. Res.* In press.

Rai, D., Bhatia, G., Palit, G., Pal, R., Singh, S., Singh, H. K., 2003a. Adaptogenic effect of *Bacopa monniera* (Brahmi). *Pharmacol. Biochem. Behav.* 75, 823-830.

Rai, D., Bhatia, G., Sen, T., Palit, G., 2003b. Anti-stress effects of *Ginkgo biloba* and *Panax ginseng*: a comparative study. *J. Pharmacol. Sci.* 93, 458-464.

Rege, N.N., Thatte, U.M., Dahanukar, S.A., 1999. Adaptogenic properties of six Rasayana herbs used in ayurvedic medicine. *Phytother. Res.* 13, 275-291.

Sapolsky, R.M., Romero, L.M., Munck, A.U., 2000. How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. *Endocr. Rev.* 21, 55-89.

Selye, H.A., 1936. Syndrome produced by Diverse Nocuous Agents. *Nature* 138, 32.

Singh, B., Gupta, D.K., Chandan, B.K., 2001. Adaptogenic activity of a glyco-peptido-lipid fraction from the alcoholic extract of *Trichopus zeylanicus* Gaertn. *Phytomedicine* 8, 283-291.

Singh, B., Chandan, B.K., Sharma, N., Singh, S., Khajuria, A., Gupta, D.K., 2005. Adaptogenic activity of glyco-peptido-lipid fraction from the alcoholic extract of *Trichopus zeylanicus* Gaerten (part II). *Phytomedicine* 12, 468-481.

Singh, A., Kumar, A., 2008. Protective effect of alprazolam against sleep deprivation-induced behavior alterations and oxidative damage in mice. *Neurosci. Res.* 60, 372-379.

Siqueira, I.R., Lara, D.R., Silva, D., Gaijeski, F.S., Nunes, D.S., Elisabetsky, E., 1998. Psychopharmacological properties of *Ptychopetalum olacoides* Bentham (Olacaceae). *Pharmac. Biol.* 36, 327-334.

Siqueira, I.R., Cimarosti, H., Fochesatto, C., Nunes, D.S., Salbego, C., Elisabetsky, E., Netto, C.A., 2004. Neuroprotective effects of *Ptychopetalum olacoides* Bentham (Olacaceae) on oxygen and glucose deprivation induced damage in rat hippocampal slices. *Life Sci.* 75, 1897-1906.

Siqueira, I.R., Fochesatto, C., Torres, I.L., da Silva, A.L., Nunes, D.S., Elisabetsky, E., Netto, C. A., 2007. Antioxidant activities of *Ptychopetalum olacoides* ("muirapuama") in mice brain. *Phytomedicine* 14, 763-769.

Siripurapu, K.B., Gupta, P., Bhatia, G., Maurya, R., Nath, C., Palit, G., 2005. Adaptogenic and anti-amnesic properties of *Evolvulus alsinoides* in rodents. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 81, 424-432.

Surwit, R.S., Schneider, M. S., 1993. Role of stress in the etiology and treatment of diabetes mellitus. *Psychosom. Med.* 55, 380-393.

Tsigos, C., Chrousos, G.P., 2002. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, neuroendocrine factors and stress. *J. Psychosom. Res.* 53, 865-871.

Wagner, H., Norr, H., Winterhoff, H., 1994. Plant Adaptogens. *Phytomedicine* 1, 63-76.

Yalcin, I., Aksu, F., Belzung, C., 2005. Effects of desipramine and tramadol in a chronic mild stress model in mice are altered by yohimbine but not by pindolol. *Eur. J. Pharmacol.* 514, 165-174.

Fig. 1

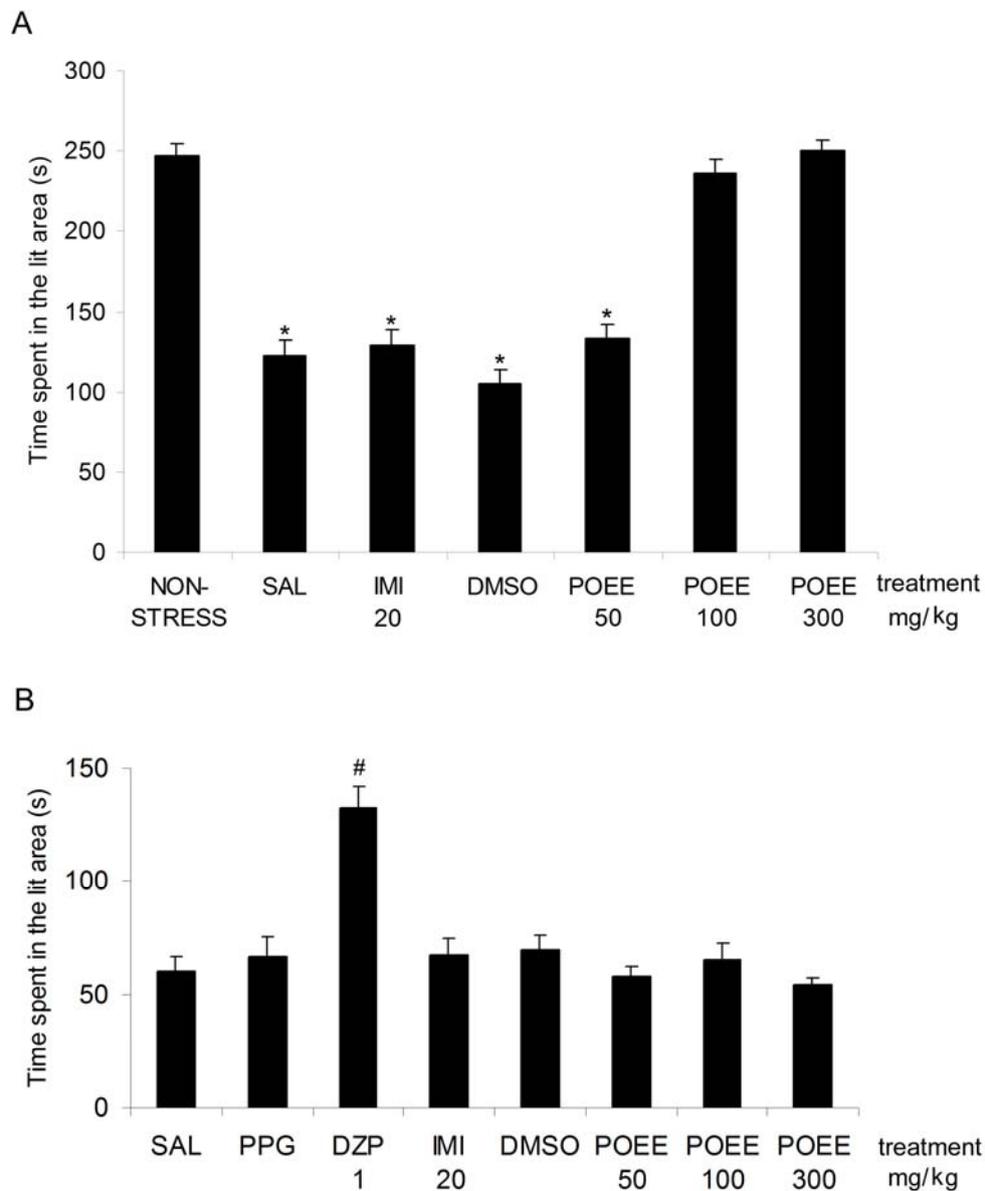


Fig. 1. Effects of POEE, imipramine and diazepam on the light/dark test. Fig. 1A: BALB/c mice submitted to UCMS. Fig. 1B: CF1 mice not submitted to UCMS, but to single drug treatment. Saline = SAL, imipramine = IMI, and diazepam = DZP. Mean \pm S.E.M. (n = 8-10). (A) * $p < 0.01$ x non-stress group and (B) # $p < 0.01$ x controls, ANOVA/Duncan.

Fig.2

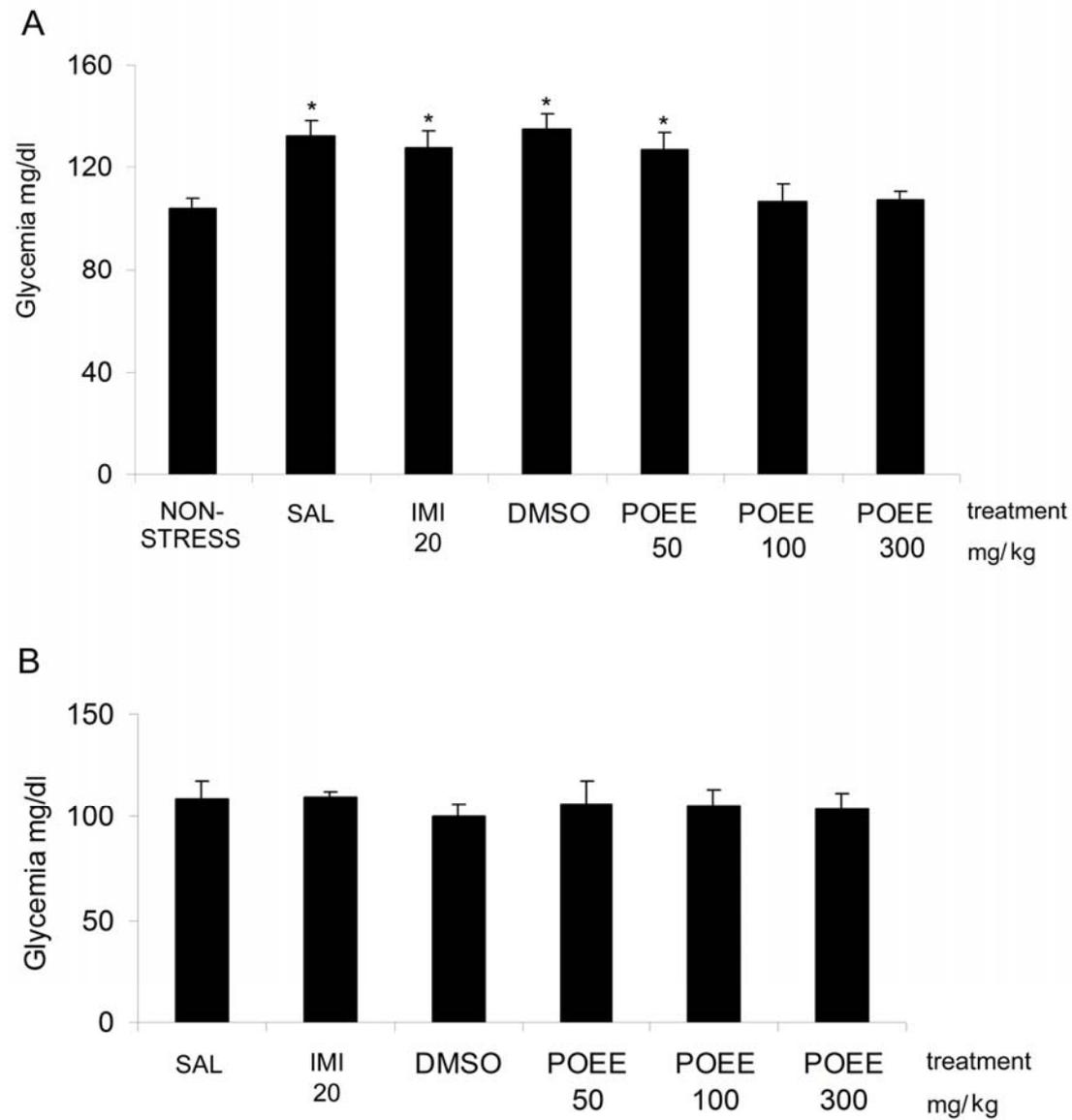
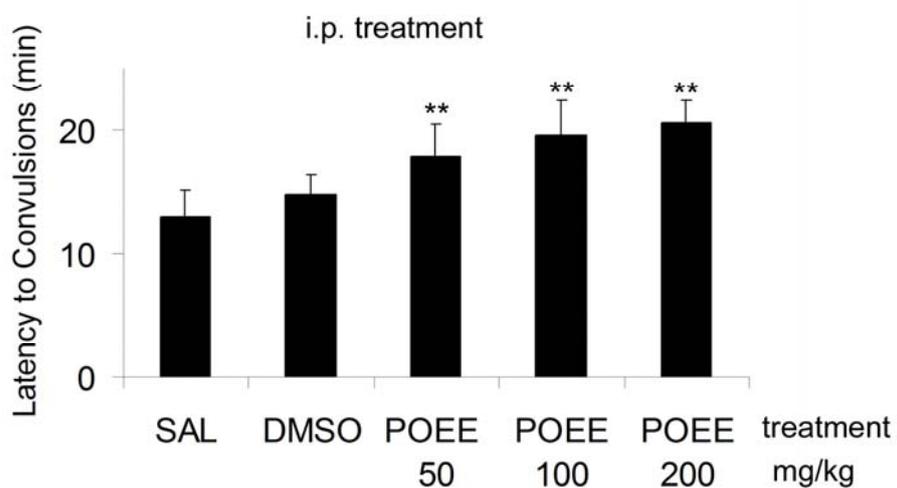


Fig. 2. Effects of POEE and imipramine on glycemia. Fig. 2A: BALB/c mice submitted to the UCMS. Fig. 1B: CF1 mice not submitted to UCMS, but to single drug treatment. Imipramine = IMI. Mean \pm S.E.M. (n = 8-10). * $p < 0.01$ x non-stress group, ANOVA/Duncan.

Fig. 3
A



B

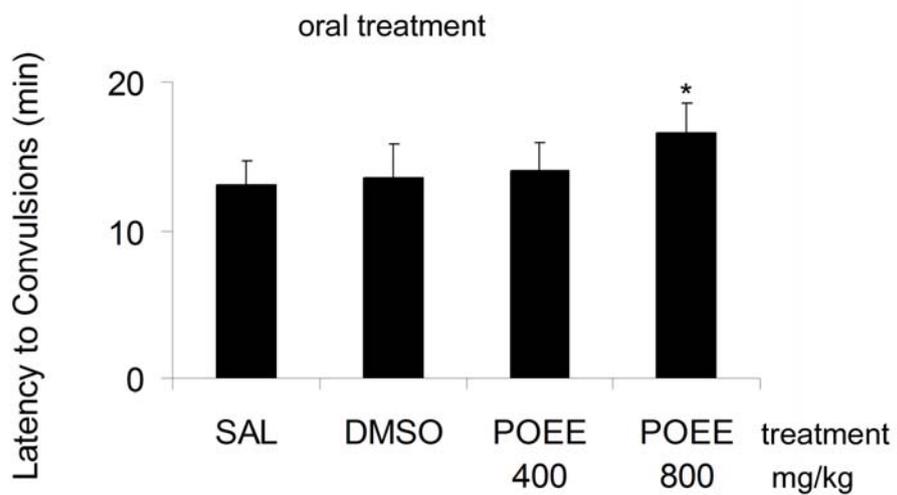


Fig. 3. Effects of POEE on mice endurance to hypoxia. Mean \pm S.E.M. (n = 6).

* $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ x controls, ANOVA/Duncan.

3.4. Ângelo L. Piato; Ana P. Herrmann; Bernardo C. Detanico; Adriano M. de Assis; Marcos L. Perry; Elisa B. Neuwald; Domingos S. Nunes; Elaine Elisabetsky.

***Ptychopetalum olacoides* (Marapuama) improves physical endurance in mice**

(Artigo a ser submetido ao periódico *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*).

PTYCHOPETALUM OLACOIDES (MARAPUAMA) IMPROVES PHYSICAL ENDURANCE IN MICE.

AL Piato^{a,b*}, AP Herrmann^a, BC Detanico^a, AM de Assis^c, ML Perry^c, EB Neuwald^d
DS Nunes^e, E Elisabetsky^{a,b}.

^aLaboratório de Etnofarmacologia, ^bPrograma de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, ^cDepartamento de Bioquímica, ^dPrograma de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil ^eDepartamento de Química, Universidade Estadual de Ponta Grossa, Campus Uvaranas, Ponta Grossa, PR, Brazil.

*Corresponding author: Ângelo L. Piato, angelopiato@gmail.com

Lab. de Etnofarmacologia, ICBS, UFRGS, Av. Sarmiento Leite 500/202, Porto Alegre, RS, 90050-170, Brazil.

Phone: 55 51 3308-3137, Fax: 55 51 3308-3121.

Keywords: *Ptychopetalum olacoides*; marapuama; muirapuama; swimming; fatigue, fitness.

ABSTRACT

Ptychopetalum olacoides (PO) Benthian (Olacaceae), known as Marapuama, is a native Brazilian plant found in the Amazon region. Beneficial claims for the use of Marapuama include improved endurance in physically stressful periods; however, no data are available on its effects on physical performance and/or energy utilization during exercise. The purpose of this study was to evaluate the effects of an extract of PO (POEE) on endurance capacity, energy metabolism, and muscle damage in mice. POEE (50, 100 and 300 mg/kg, p.o.) produced a significant increase in swimming time to exhaustion; this effect was maintained up to 48 h but not 72 h after the last dose. POEE attenuated glycogen and glucose consumption in exercised mice. Moreover, POEE prevented lactate accumulation and increased NEFA mobilization. Regarding muscle damage, POEE prevented the exercise-induced increase in CK and LDH. Taken together, these results suggest that POEE possesses anti-fatigue properties as a result of more effective energy utilization and protection from muscle damage. The data are in agreement with the traditional claims for use of this species during periods of high energy demand as well as its renewed fame as a useful aid to fitness.

1. Introduction

The growing awareness about the key role of lifestyle in prevalent diseases such as hypertension, diabetes, cardiovascular disorders and obesity has encouraged a significant part of the population to adopt healthier lifestyles. Engaging in regular exercise is perceived as a valid effort to minimize the consequences of stressful daily schedules, to improve physical and psychological wellbeing, and to prevent a variety of chronic diseases (Kruk, 2007; Heckman and McKelvie, 2008). Recognized benefits of moderate regular exercise include the activation of the immune system (Haaland et al., 2008), a decrease in the incidence of osteoarthritis and cardiovascular events in the elderly population (Hart et al., 2008; Heckman and McKelvie, 2008), and positive effects on mood and anxiety disorders (Dunn et al., 2001; Lawlor and Hopker, 2001; Strohle, 2008).

In the context of “a healthier lifestyle”, nutritional supplements have found a significant niche. Substances that could enhance physical and/or mental endurance, often named as “anti-stress”, “anti-fatigue” and/or “fat-burners”, are sought after to ameliorate exercise capability, boost athletic performance, or maximize the benefits of exercise for losing or maintaining weight.

The popularity of such products can be measured by the nearly 650,000 entries retrieved from the web by using “fat-burner and herbal” as keywords. Caffeine (Ryu et al., 2001), creatine (Demant and Rhodes, 1999), and amino acids (Coombes and McNaughton, 2000) are among the best-studied compounds, with limited and controversial effects on physical performance (Bemben and Lamont, 2005). Among herbals, green tea (*Camelia sinensis*, Murase et al., 2005, 2006), fenugreek (*Trigonella foenum greaecum*, Ikeuchi et al., 2006a), Japanese apricot (*Prunus mume*, Kim et al., 2008) and ginseng (*Panax ginseng*, Grandhi et al., 1994; Bahrke and Morgan, 2000) have been shown to increase endurance in rodent models.

In Amazonian communities, Marapuama (*Phychopetalum olacoides* (PO) Benth., Olacaceae) is a well known medicinal species regarded as a “tonic” or “nerve tonic” in the context of local traditional medical concepts. Beneficial claims for the use of Marapuama (or Muirapuama) include improved endurance in particularly stressful (mentally or physically) periods (Elisabetsky and Siqueira, 1998), making

Marapuama-based beverages popular, for instance, among gold miners and students facing approaching exams. Marapuama's reputation shaped market niches in several countries, where it is found as herbals, as a component in multivitamin formulas and/or in energizer drinks used to achieve physical and mental stimulation, improve fitness, or as "fat-burners".

Despite the traditional and growing popular use of Marapuama-containing supplements, there are no data available concerning its effects on physical performance or energy utilization during exercise. The purpose of this study was to evaluate the effects of a standardized hydroalcoholic extract of PO (POEE) on exercise endurance, energy metabolism and muscle damage. Mouse swimming models were used in combination with biochemical assessments of energy utilization (glycogen, glucose, lactate, and nonesterified fatty acids [NEFA]) and muscle damage (creatinase kinase [CK] and lactate dehydrogenase [LDH]).

2. Materials and Methods

2.1 Animals: Two months old (40-45 g) CF1 male mice obtained from Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (FEPPS) were used. Mice were housed in plastic cages (40 x 33 x 16 cm, 5-8 per cage), and maintained under controlled environmental conditions (22 ± 1 °C, 12 h-light/dark cycle, free access to food [Nuvilab CR1] and water) in our own animal facility for at least two weeks before experiments. During experiments mice were fasted for 6 h before oral treatments. The project was approved (# 2006543) by the University ethics committee.

2.2 Extract: *P. olacoides* Bentham (Olacaceae) was collected in Pará (Brazil), and identified by Nelson Rosa (voucher MPEG 108.036, Goeldi Museum). POEE is a standardized hydroalcoholic extract of *P. olacoides* roots (6% yield). The fingerprinting by HPLC (HP 1100 system, Agilent Technologies, USA) is detailed in Siqueira et al. (2007).

2.3 Drugs: *Panax quinquefolium* (PQ) root powder was acquired from Sigma (USA), and freshly prepared for each experiment as a homogeneous suspension in saline (0.9% NaCl). POEE was dissolved in 20% DMSO. All drugs were given as 0.1 ml/10 g body weight.

2.4 Swimming Models: The protocols were adapted from Ikeuchi et al. (2006b); pilot experiments were conducted to adapt swimming conditions (especially load weights) so that swimming capacity matched the ones there reported.

Experiment 1: Swimming was carried out in a glass tank (28 x 46 x 29 cm, 26 cm water depth), equipped with an aquarium thermostat to maintain the water at 30 ± 1 °C. Groups of mice (n = 6-8) were treated orally between 14:00 and 14:30 h Monday to Friday, for five weeks, with saline (SAL), PQ (100 mg/kg), 20% DMSO, or POEE (50, 100 and 300 mg/kg). Every Friday mice were weighed and submitted to swimming (between 10:30 h and 11:00 h) with loads (lead fish sinkers) equivalent to 8% of the body weight attached to the tail. Mice exercised until they failed to rise to the water surface within 5 seconds (exhaustion), and at this point they were withdrawn from the tank and gently towel dried before being returned to their home cage. Although mice were treated daily for 5 days (to comply with the reported protocol), swimming was performed before drug administration in order to avoid acute drug effects during the exercise. In order to verify lasting effects of treatments, mice were also submitted to swimming 48 and 72 h after the last drug administration.

Experiment 2: In the same water tanks, mice were submitted to 15 min of swimming with loads equivalent to 4% of the body weight attached to the tails. Groups of mice (n = 6) were treated orally between 14:00 and 14:30 h, daily for 15 days, with saline (SAL), PQ (100 mg/kg), 20% DMSO, or POEE (50 and 300 mg/kg); swimming took place 24 h after the last drug administration.

2.5 Locomotion: During the 5 weeks of experiment 1, mice were evaluated weekly for locomotion. Animals were individually placed in activity cages (45 x 25 x 20 cm, Albarsch Electronic Equipment, Brazil) and locomotion was automatically recorded (number of crossings, three parallel photocells) for 5 min after a 2 min exploration period.

2.6 Biochemical analysis: Blood samples were collected from the abdominal inferior vena cava (under 100/20 mg/kg i.p. ketamine/xylazine anesthesia) immediately after experiment 2. Blood samples were centrifuged at 3,000 g for 10 min, and the serum stored at -20 °C. Serum glucose levels were determined with a glucometer tape (Accu-Chek Active® Roche), and commercial kits were used to measure serum levels

of CK (Labtest Diagnóstica, MG, Brazil), LDH (Labtest Diagnóstica, MG, Brazil), lactate (Katal Biotecnológica, MG, Brazil) and NEFA (Roche, Penzberg, Germany).

The gastrocnemius muscle and a liver slice were quickly removed immediately after blood collection and stored in 1 ml KOH solution at -20 °C. Glycogen content was determined by the colorimetric method described by Krisman (1962).

2.7 Statistical Analysis: Data are expressed as mean \pm S.E.M. Repeated measures analysis of variance (MANOVA) followed by Duncan post hoc was used to evaluate swimming endurance. Biochemical data were analyzed by two-way ANOVA followed by Tukey post hoc. SPSS 15.0 for Windows was used, and a significance level of $P < 0.05$ was adopted.

3. Results

Figure 1 shows results from experiment 1. The MANOVA/Duncan analysis showed that POEE (100 and 300 mg/kg) and PQ (100 mg/kg) significantly ($F_{(5,30)} = 36.3$, $P < 0.05$) increased swimming endurance, an effect already noticeable in the first week; the effects of the lowest POEE dose (50 mg/kg) only became significant ($P < 0.05$) after two weeks of treatment. The increase in swimming capacity remained stable throughout the remaining 4 weeks, and lasted for 48 (but not 72) hours after the last administration. There were no significant differences in locomotion among the various groups at any given point in time ($F_{(5,30)} = 1.1$, $P > 0.05$, data not shown).

Data on glycogen and glycemia (after 15 min of swimming) are presented in Figure 2. For muscle glycogen (Fig. 2A), a two-way ANOVA revealed a main effect of exercise ($F_{(1,59)} = 339.4$, $P < 0.01$), treatment ($F_{(4,59)} = 10.9$, $P < 0.01$), and of exercise x treatment interaction ($F_{(4,59)} = 5.5$, $P < 0.01$). Regarding liver glycogen (Fig. 2B), a two-way ANOVA revealed a main effect of exercise ($F_{(1,59)} = 390.3$, $P < 0.01$), treatment ($F_{(4,59)} = 11.0$, $P < 0.01$), and of exercise x treatment interaction ($F_{(4,59)} = 12.3$, $P < 0.01$). The post hoc analyses indicated that POEE, as well as PQ, diminished ($P < 0.05$) the exercise-induced glycogen consumption in both liver and muscle. For glycemia (Fig. 2C), a two-way ANOVA revealed a main effect of exercise ($F_{(1,59)} = 390.3$, $P < 0.01$), treatment ($F_{(4,59)} = 11.0$, $P < 0.01$), and of exercise x treatment interaction ($F_{(4,59)} = 12.3$,

$P < 0.01$). The post hoc analyses indicated that the exercise-induced decrease in glucose was attenuated ($P < 0.05$) by POEE and PQ.

Data on lactate and nonesterified fatty acids (after 15 min of swimming) are shown in Figure 3. For lactate (Fig. 3A), a two-way ANOVA revealed a main effect of exercise ($F_{(1,59)}=60.0$, $P < 0.01$), treatment ($F_{(4,59)}=19.2$, $P < 0.01$), and exercise x treatment interaction ($F_{(4,59)}=25.1$, $P < 0.01$). The post hoc analyses indicated that POEE and PQ completely prevented ($P < 0.05$) the exercise-induced increase in lactate. For NEFA (Fig. 3B), a two-way ANOVA revealed a main effect of exercise ($F_{(1,59)}=138.6$, $P < 0.01$), treatment ($F_{(4,59)}=12.5$, $P < 0.01$), and exercise x treatment interaction ($F_{(4,59)}=11.6$, $P < 0.01$). The post hoc analyses indicated that while the exercise *per se* did not alter the levels of NEFA in control groups, increased ($P < 0.05$) NEFA levels are seen in exercised mice treated with POEE and PQ.

Data on CK and LDH (after 15 min of swimming) are shown in Figure 4. For CK (Fig. 4A), a two-way ANOVA revealed a main effect of exercise ($F_{(1,59)}=161.6$, $P < 0.01$), treatment ($F_{(4,59)}=27.9$, $P < 0.01$), and exercise x treatment interaction ($F_{(4,59)}=18.5$, $P < 0.01$). The post hoc analyses indicated that POEE and PQ completely prevented the increase in CK induced by exercise. Regarding LDH (Fig. 4B), a two-way ANOVA revealed a main effect of exercise ($F_{(1,59)}=106.6$, $P < 0.01$), treatment ($F_{(4,59)}=16.7$, $P < 0.01$), and exercise x treatment interaction ($F_{(4,59)}=26.8$, $P < 0.01$). The post hoc analyses indicated that POEE and PQ fully prevented the exercise-induced increase in LDH.

There were no differences in body weight gain among the groups ($P > 0.05$) throughout the experiment (0.6 g/week on average during the 5 weeks, data not shown).

4. Discussion

This study shows that oral treatments with POEE or PQ were effective in improving the endurance of mice swimming with significant loads. The effects were already apparent after the first 4 doses, remained constant during the 5 weeks treatment, and lasted for 48 (but not 72) hours after treatment cessation. Although there was not a clear dose-dependent effect, the lowest POEE dose required a longer treatment period to become effective. In order to examine the mechanisms of action underlying this

apparent anti-fatigue property of POEE, the pattern of energy utilization and evidence of muscle damage were assessed after 15 min of swimming. A similar analysis was not carried out after swimming until exhaustion, a procedure likely to dramatically interfere with these parameters in all groups.

Exercise-induced fatigue is associated with depletion of energy sources, such as glycogen and glucose (Hargreaves, 2004), and/or the production and accumulation of metabolic products such as lactic acid and ammonia (Pedersen et al., 2004). Muscle glycogen is the first readily available energy source used in exercise, and its depletion is associated with physical exhaustion, while a slower utilization of glycogen results in improved exercise performance (Hargreaves, 2004). In agreement, it has been shown that training slows the decline in muscle glycogen content (Karlsson et al., 1974) and induces a lower rate of glucose utilization (Coggan et al., 1990) during exercise. The exercise protocol adopted in the present study clearly increased glucose consumption as indicated by significant drops in glycogen (muscle and liver) and glucose levels in the control groups. These exercise-induced decreases in both glycogen and glucose levels were significantly attenuated by POEE and/or PQ treatments. A slower muscle glycogenolysis is also supported by the decreased lactate levels observed in POEE treated groups, in itself a potential contributing factor to the overall anti-fatigue effect by averting lactic acidemia. Alternative patterns of energy sourcing, such as a shift from carbohydrate to fat, have been shown to be central to the improved endurance acquired through training (Coggan et al., 2000). While the exercise protocol used here did not lead to increases in NEFA levels in control groups, they were significantly increased in POEE (and PQ) groups. Such an increase in fatty acid availability (by increased lipolysis) is coherent with the observed glycogen-sparing effect. Previous studies reported that green tea and fenugreek extracts prompt an effective utilization of fatty acid during exercise, thus reducing the glycogen depletion rate leading to improved exercise endurance in untrained rodents (Murase et al., 2005, 2006; Ikeuchi et al., 2006a). The results of our study suggest that this is also the case with POEE treatment.

Serum CK and LDH levels are important indicators of the status of muscle tissue, with increases associated with injury-induced cellular necrosis or strenuous exercise-

induced tissue damage (Brancaccio et al., 2007; Brancaccio et al., 2008). Alterations in serum concentrations of muscle enzymes (e.g., CK and LDH) have been reported in normal subjects and athletes after strenuous exercise (Munjal et al., 1983), since myoglobin and these energy metabolism enzymes may leak from ruptured muscle cells into the bloodstream. Our data show that POEE completely prevented the degree of muscle damage clearly induced by the adopted swimming protocol. This protective effect adds to the above discussed improvement in energy utilization in promoting the observed improvement in endurance.

It is accepted that the energy expenditure during exercise leads to increased production of reactive oxygen species by the skeletal muscle mitochondria (McArdle et al., 2005), which is suggested to be a contributing factor to muscle fatigue (Reid, 2008). The reported POEE antioxidant properties (Siqueira et al., 2007) may be an additional factor in its antifatigue effect, as also suggested for green tea in rodents submitted to treadmill exercise until exhaustion (Murase et al., 2006).

In conclusion, this study shows that POEE possesses anti-fatigue properties, likely to result from a more effective energy consumption (glycogen sparing along with increased fatty acid burning) and protection from muscle damage (decreased CK and LDH). These results agree with the traditional claims for using this species during periods of high energy demand as well as its renewed reputation as a useful aid to fitness.

Acknowledgements

The authors are grateful to CNPq for fellowships.

References

- Bahrke, MS, Morgan, WR. Evaluation of the ergogenic properties of ginseng: an update. *Sports Med* 2000;29:113-133.
- Bemben, MG, Lamont, HS. Creatine supplementation and exercise performance: recent findings. *Sports Med* 2005;35:107-125.

Brancaccio, P, Maffulli, N, Buonauro, R, Limongelli, FM. Serum enzyme monitoring in sports medicine. *Clin Sports Med* 2008;27:1-18.

Brancaccio, P, Maffulli, N, Limongelli, FM. Creatine kinase monitoring in sport medicine. *Br Med Bull* 2007;81-82:209-230.

Coggan, AR, Kohrt, WM, Spina, RJ, Bier, DM, Holloszy, JO. Endurance training decreases plasma glucose turnover and oxidation during moderate-intensity exercise in men. *J Appl Physiol* 1990;68:990-996.

Coggan, AR, Raguso, CA, Gastaldelli, A, Sidossis, LS, Yeckel, CW. Fat metabolism during high-intensity exercise in endurance-trained and untrained men. *Metabolism* 2000;49:122-128.

Coombes, JS, McNaughton, LR. Effects of branched-chain amino acid supplementation on serum creatine kinase and lactate dehydrogenase after prolonged exercise. *J Sports Med Phys Fitness* 2000;40:240-246.

Demant, TW, Rhodes, EC. Effects of creatine supplementation on exercise performance. *Sports Med* 1999;28:49-60.

Dunn, AL, Trivedi, MH, O'Neal, HA. Physical activity dose-response effects on outcomes of depression and anxiety. *Med Sci Sports Exerc* 2001;33:S587-597; discussion 609-510.

Elisabetsky, E, Siqueira, IR. Is there a psychopharmacological meaning for traditional tonics? In: Prendergast HDV, Etkin NL, Harris DR and Houghton PJ, editors. *Plants for Food and Medicines*. Royal Botanical Gardens, Kew; 1998. p. 373-385.

Grandhi, A, Mujumdar, AM, Patwardhan, B. A comparative pharmacological investigation of Ashwagandha and Ginseng. *J Ethnopharmacol* 1994;44:131-135.

Haaland, DA, Sabljic, TF, Baribeau, DA, Mukovozov, IM, Hart, LE. Is regular exercise a friend or foe of the aging immune system? A systematic review. *Clin J Sport Med* 2008;18:539-548.

Hargreaves, M. Muscle glycogen and metabolic regulation. *Proc Nutr Soc* 2004;63:217-220.

Hart, LE, Haaland, DA, Baribeau, DA, Mukovozov, IM, Sabljic, TF. The relationship between exercise and osteoarthritis in the elderly. *Clin J Sport Med* 2008;18:508-521.

Heckman, GA, McKelvie, RS. Cardiovascular aging and exercise in healthy older adults. *Clin J Sport Med* 2008;18:479-485.

Ikeuchi, M, Yamaguchi, K, Koyama, T, Sono, Y, Yazawa, K. Effects of fenugreek seeds (*Trigonella foenum graecum*) extract on endurance capacity in mice. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 2006a;52:287-292.

Ikeuchi, M, Koyama, T, Takahashi, J, Yazawa, K. Effects of astaxanthin supplementation on exercise-induced fatigue in mice. *Biol Pharm Bull* 2006b;29:2106-2110.

Karlsson, J, Nordesjo, LO, Saltin, B. Muscle glycogen utilization during exercise after physical training. *Acta Physiol Scand* 1974;90:210-217.

Kim, S, Park, SH, Lee, HN, Park, T. *Prunus mume* extract ameliorates exercise-induced fatigue in trained rats. *J Med Food* 2008;11:460-468.

Krisman, CR. A method for the colorimetric estimation of glycogen with iodine. *Anal Biochem* 1962;4:17-23.

Kruk, J. Physical activity in the prevention of the most frequent chronic diseases: an analysis of the recent evidence. *Asian Pac J Cancer Prev* 2007;8:325-338.

Lawlor, DA, Hopker, SW. The effectiveness of exercise as an intervention in the management of depression: systematic review and meta-regression analysis of randomised controlled trials. *BMJ* 2001;322:763-767.

McArdle, F, Pattwell, DM, Vasilaki, A, McArdle, A, Jackson, MJ. Intracellular generation of reactive oxygen species by contracting skeletal muscle cells. *Free Radic Biol Med* 2005;39:651-657.

Munjjal, DD, McFadden, JA, Matix, PA, Coffman, KD, Cattaneo, SM. Changes in serum myoglobin, total creatine kinase, lactate dehydrogenase and creatine kinase MB levels in runners. *Clin Biochem* 1983;16:195-199.

Murase, T, Haramizu, S, Shimotoyodome, A, Nagasawa, A, Tokimitsu, I. Green tea extract improves endurance capacity and increases muscle lipid oxidation in mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2005;288:R708-715.

Murase, T, Haramizu, S, Shimotoyodome, A, Tokimitsu, I, Hase, T. Green tea extract improves running endurance in mice by stimulating lipid utilization during exercise. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2006;290:R1550-1556.

Pedersen, TH, Nielsen, OB, Lamb, GD, Stephenson, DG. Intracellular acidosis enhances the excitability of working muscle. *Science* 2004;305:1144-1147.

Reid, MB. Free radicals and muscle fatigue: Of ROS, canaries, and the IOC. *Free Radic Biol Med* 2008;44:169-179.

Ryu, S, Choi, SK, Joung, SS, Suh, H, Cha, YS, Lee, S, Lim, K. Caffeine as a lipolytic food component increases endurance performance in rats and athletes. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 2001;47:139-146.

Siqueira, IR, Fochesatto, C, Torres, ILS, da Silva, AL, Nunes, DS, Elisabetsky, E, Netto, CA. Antioxidant activities of *Ptychopetalum olacoides* ("muirapuama") in mice brain. *Phytomedicine* 2007;14:763-769.

Strohle, A. Physical activity, exercise, depression and anxiety disorders. *J Neural Transm* 2008.

Fig.1

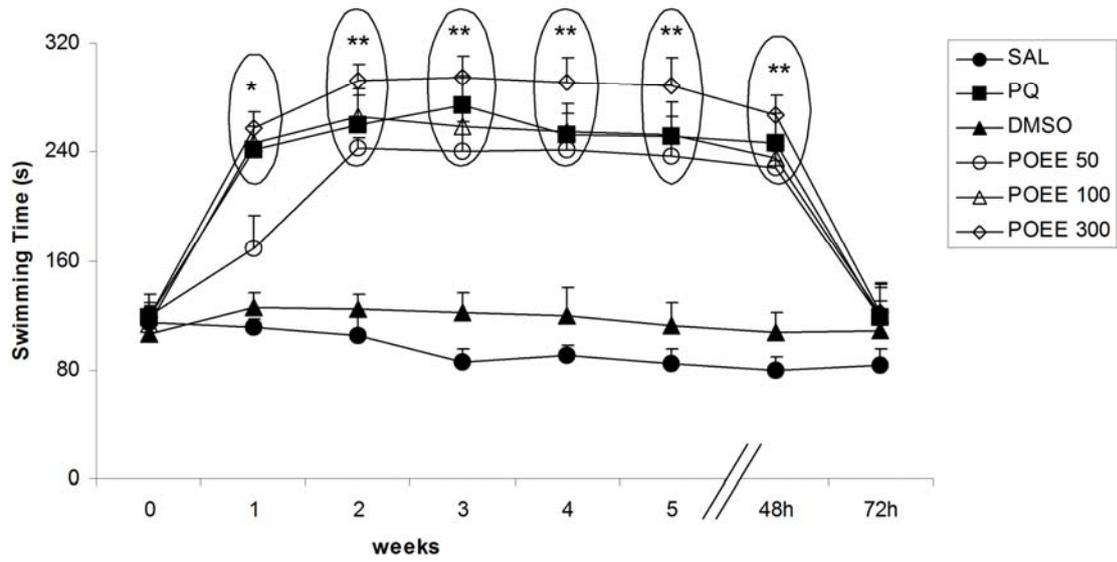
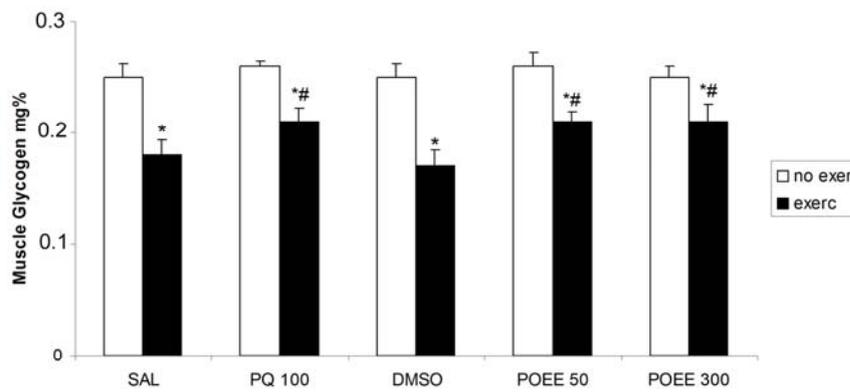


Fig. 1. Effects of POEE and PQ on swimming endurance. Mean \pm S.E.M. (n = 6-8).

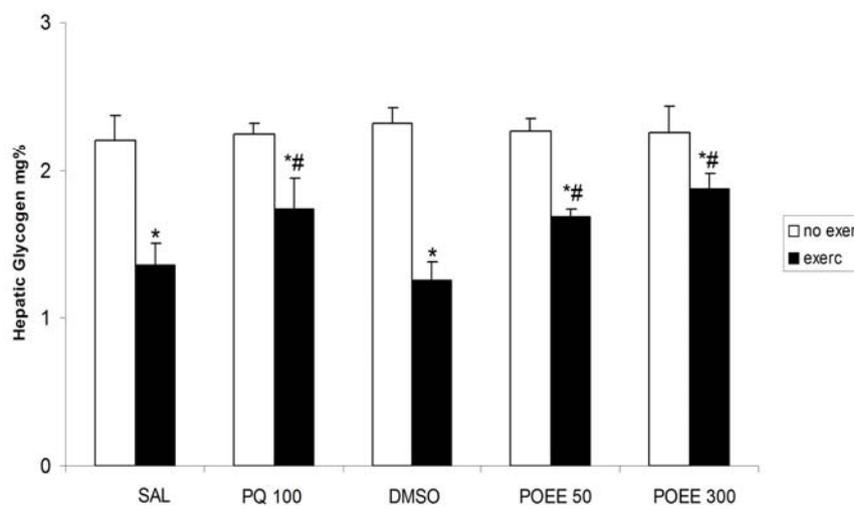
* $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ x controls. Repeated measures ANOVA/Duncan.

Fig.2

A)



B)



C)

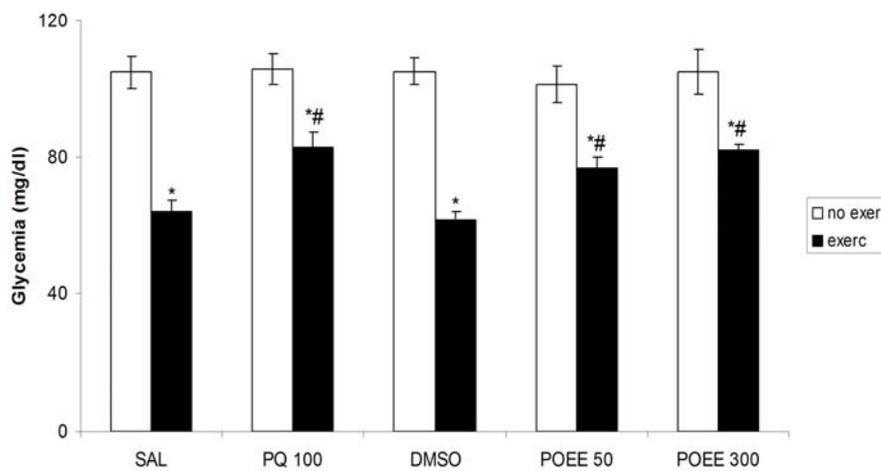


Fig. 2. Effects of POEE and PQ on muscle (2A) and liver (2B) glycogen and glycemia (2C) in non-exercised and exercised mice. Mean \pm S.E.M. (n = 6). * $P < 0.05$ x non-exercised control; # $P < 0.05$ x exercised control. Two-way ANOVA/ Tukey.

Fig. 3

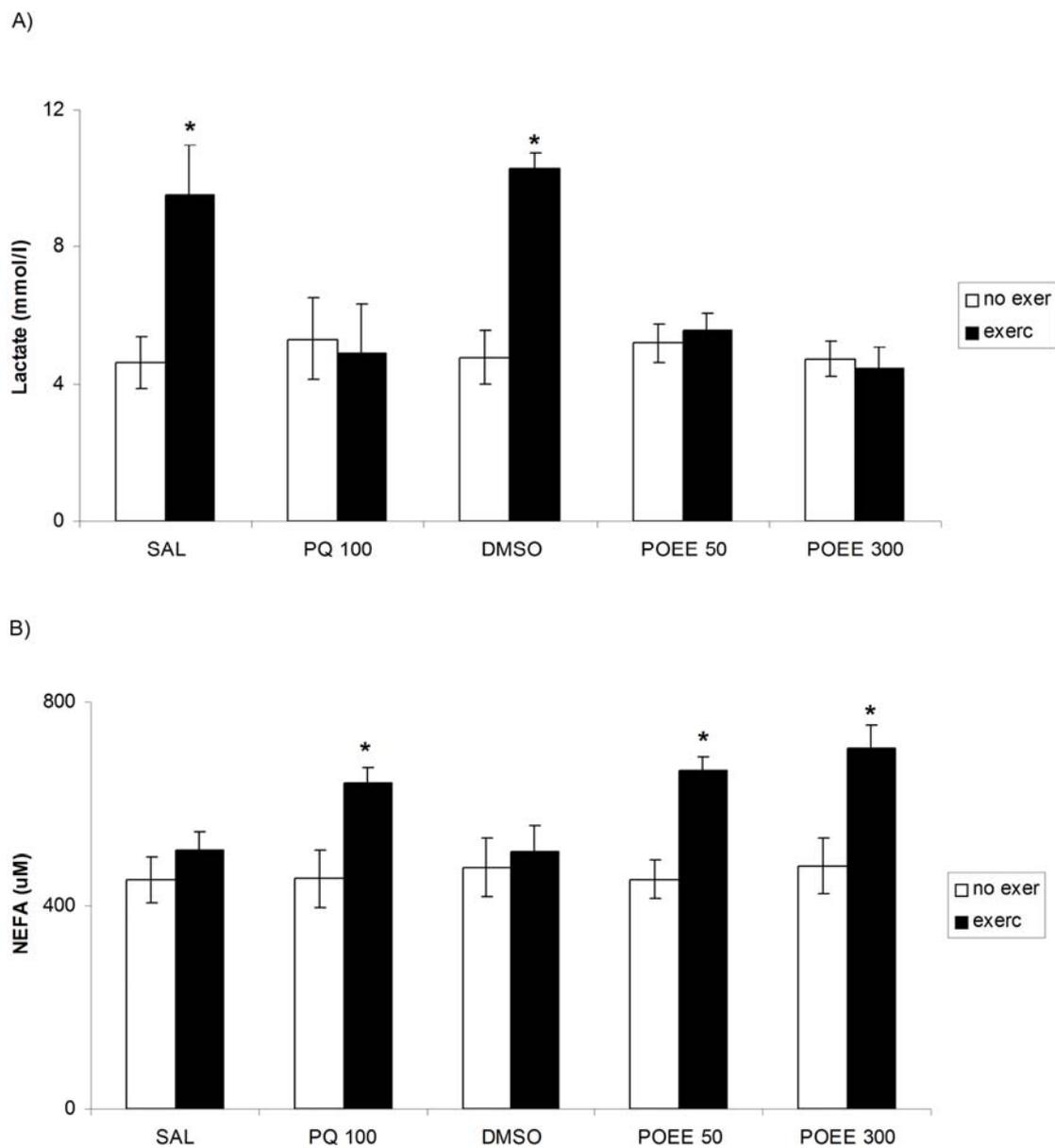


Fig. 3. Effects of POEE and PQ on serum lactate (3A) and NEFA (3B) levels in non-exercised and exercised mice. Mean \pm S.E.M. (n = 6). *P<0.05 x non-exercised control. Two-way ANOVA/ Tukey.

Fig. 4

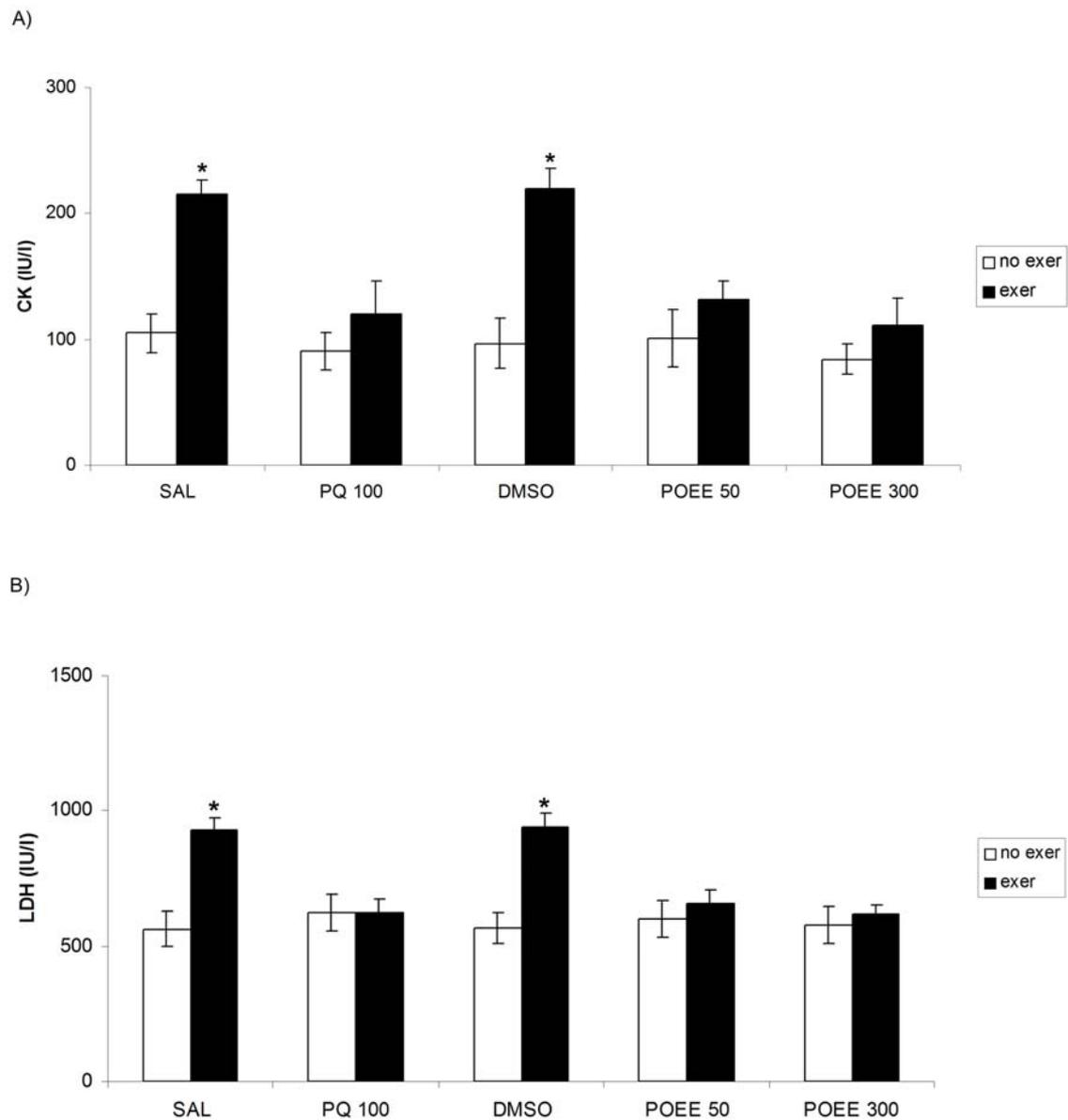


Fig. 4. Effects of POEE and PQ on serum CK (4A) and LDH (4B) levels in non-exercised and exercised mice. Mean \pm S.E.M. (n = 6). *P<0.05 x non-exercised control. Two-way ANOVA/ Tukey.

4. DISCUSSÃO

O estresse é freqüentemente definido como uma ameaça, real ou implícita, à homeostase. McEwen (2003: p. 4) define o estresse como “eventos ameaçadores ao indivíduo que provocam respostas comportamentais e fisiológicas”. A persistência ou intensidade exagerada do estresse pode causar danos potenciais ao organismo (SWAAB *et al.*, 2005; ELENKOV e CHROUSOS, 2006; McEWEN, 2008). Ainda que o estresse seja parte integral de todos os seres vivos, a vida moderna parece ser particularmente pouco favorável ao equilíbrio e ao desenvolvimento pleno e sadio do corpo humano, freqüentemente levando ao esgotamento de suas capacidades adaptativas. Devido à relevância e à natureza não-específica do estresse em várias patologias, adaptógenos têm sido estudados como uma classe de agentes terapêuticos de origem vegetal capazes de promover uma adaptação às situações estressantes, apresentando uma ação normalizadora, prevenindo distúrbios causados por estressores (PANOSSIAN *et al.*, 1997, REGE *et al.*, 1999, DAVYDOV e KRIKORIAN, 2000, DHULEY, 2000, 2001; SINGH *et al.*, 2001, PANOSSIAN e WAGNER, 2005). Diferentemente da medicina alopática, onde se consideram grupos de drogas relacionadas ao tratamento de patologias específicas, propõe-se que adaptógenos possam ser utilizados na prevenção e tratamento de inúmeras patologias (PANOSSIAN e WIKMAN, 2005). Além disso, adaptógenos poderiam ser usados por indivíduos saudáveis com o objetivo de melhorar a condição geral da saúde, a qualidade de vida, o desempenho físico, sexual e de funções cognitivas (PANOSSIAN *et al.*, 1999; SPASOV *et al.*, 2000).

Considerando a relação entre estresse e depressão e o uso tradicional e popular de Marapuama como agente anti-estresse e antifadiga, o objetivo geral desse trabalho foi estudar a atividade antidepressiva de um extrato padronizado desta espécie (EEPO) e verificar seus efeitos sobre parâmetros relacionados ao exercício em camundongos.

Os resultados indicaram que EEPO, administrado tanto por via intraperitoneal como por via oral, diminuiu significativamente o tempo de imobilidade nos testes de nado forçado (FST) e suspensão pela cauda (TST). Com o objetivo de elucidar o mecanismo de ação tipo antidepressivo, verificamos a participação dos sistemas noradrenérgico, dopaminérgico e serotoninérgico através do uso de inibidores de síntese

e antagonistas. Os resultados sugerem que o efeito antiimobilidade de EEPO envolve o sistema noradrenérgico e dopaminérgico, mas não o serotoninérgico. Além disso, verificou-se que o efeito tipo antidepressivo de EEPO nesses dois modelos é mediado por receptores D_1 dopaminérgico e β -adrenérgico, sugerindo um mecanismo de ação inovador. A participação desses sistemas de neurotransmissores na depressão e na ação de antidepressivos é bem descrita na literatura (D'AQUILA *et al.*, 2000; MILLER *et al.*, 2001; DUNLOP e NEMEROFF, 2007). Em relação ao sistema noradrenérgico, sugere-se que o aumento da transmissão adrenérgica é um componente importante para o efeito antidepressivo ou ainda uma via específica pelo qual o efeito antidepressivo pode ser alcançado (MILLER *et al.*, 2001). Em relação à dopamina, sugere-se que a anedonia, condição central na depressão, seria resultado de uma inibição dopaminérgica no sistema mesolímbico/*accumbens* com conseqüente diminuição de respostas a estímulos reforçadores (DUNLOP e NEMEROFF, 2007). Consistente com o resultado obtido nesse estudo, o agonista dopaminérgico SKF 38393 apresentou efeito tipo antidepressivo similar à imipramina no FST (D'AQUILA *et al.*, 1994), e o efeito tipo antidepressivo de imipramina foi antagonizado por SCH 23390 (antagonista D_1) (D'AQUILA *et al.*, 1994; GAMBARANA *et al.*, 1995). Além disso, SCH 23390 também bloqueia o efeito tipo antidepressivo de bupropiona e nomifensina no FST (YAMADA *et al.*, 2004). Esses resultados apóiam a idéia de que a estimulação de receptores D_1 tem um papel importante na ação de antidepressivos e que agonistas desse receptor são potenciais agentes antidepressivos. O envolvimento do receptor D_1 nos efeitos de EEPO no FST e TST é consistente com a hipótese que relaciona dopamina e depressão e também com a habilidade do extrato de reverter a ptose induzida por reserpina (SIQUEIRA *et al.*, 1998).

Diferentemente dos modelos citados anteriormente, o modelo de estresse crônico moderado imprevisível (UCMS) apresenta, além de preditibilidade, excelente valor de face e de homologia (WILLNER, 1990). Além dessas vantagens, no contexto desta tese, esse modelo tem a vantagem de relacionar o estresse com a depressão, permitindo ainda relacionar a atividade antidepressiva com o status do eixo HPA, central nas respostas ao estresse, para alguns alostasia. Como esperado, o UCMS induziu degradação do pêlo, diminuição do comportamento de *grooming* (diminuição

no consumo de sacarose) (WILLNER, 2005) e aumento nos níveis de corticosterona. EEPO preveniu os distúrbios causados pelo UCMS nos três parâmetros avaliados de forma semelhante à imipramina. A normalização do eixo HPA parece estar relacionada com o sucesso do tratamento com antidepressivos (BARDEN, 2004) e pode-se sugerir que esta tenha sido também a ação de EEPO. Cabe notar que a normalização do eixo HPA sob condições sustentadas de estresse também seria uma ação esperada de plantas adaptógenas. Estudos mostram que o tratamento crônico com antidepressivos leva a um aumento na expressão de receptores de glicocorticóides (GR) em regiões críticas para a regulação do eixo HPA, como por exemplo, o hipocampo (THOMSON e CRAIGHEAD, 2008). Assim, antidepressivos aumentariam os níveis de mRNA de GR, diminuindo níveis circulantes de ACTH e corticosterona (BARDEN, 2004). O efeito de EEPO sobre o eixo HPA ainda não está totalmente elucidado e medidas dos níveis de CRH e ACTH pós-estresse seriam desejáveis para melhor esclarecer este efeito.

A fim de verificar os efeitos do extrato em diversas modalidades de estresse, o próximo passo foi verificar o efeito de EEPO sobre os níveis de ansiedade e glicose em animais submetidos ao UCMS. Embora EEPO não pareça apresentar nenhum efeito sobre a ansiedade (teste de claro-escuro) e a glicemia, ao fim do protocolo de UCMS os animais tratados com EEPO (mas não com imipramina) tiveram comportamento similar aos animais não-estressados tanto no teste de claro-escuro quanto nos níveis glicêmicos. Quando animais são expostos ao estresse causado por um ambiente caracterizado por baixo suprimento de oxigênio, instaura-se um estado de estresse oxidativo (MORIN *et al.*, 2001) e caem os níveis de noradrenalina cerebral (GEORGIEV *et al.*, 1995). A resistência à hipóxia (medida como latência para a convulsão) em animais tratados com EEPO (i.p. e v.o.) pode, pelo menos em parte, ser explicada pela sua atividade neuroprotetora e antioxidante (SIQUEIRA *et al.*, 2004, 2007) e pela provável ação do extrato em receptores noradrenérgicos (SIQUEIRA *et al.*, 1998). Em conjunto, estes dados podem ser interpretados como um aumento de resistência inespecífica ao estresse induzido por EEPO, novamente remetendo ao conceito de adaptógeno.

Considerando o uso tradicional de Marapuama em situações de grande esforço físico (é popular, por exemplo, entre garimpeiros) e sua presença no mercado de fitoterápicos no contexto de desempenho físico (termogênico, emagrecedor), o último objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito de EEPO no exercício. No primeiro experimento foi avaliada, durante cinco semanas, a capacidade de nado dos animais até a exaustão física (tempo máximo de natação forçada com carga de 8% da massa corporal). Animais tratados com EEPO apresentaram melhora na capacidade de nado já na primeira semana de tratamento, diferenciando-se dos animais controle durante todo o tratamento e até 48 horas após o último tratamento. O resultado com EEPO foi semelhante ao obtido com extrato de *P. quinquefolium* (PQ), conhecido agente antifadiga.

O experimento seguinte teve como objetivo avaliar se alterações no metabolismo energético e/ou prevenção ao dano muscular induzido por exercício seriam correlatos da maior resistência observada em animais tratados com EEPO. Grupos de camundongos foram tratados por 15 dias e após 24 horas do último tratamento foram submetidos à natação forçada com carga de 4% da massa corporal durante 15 minutos; em paralelo, grupos de animais não exercitados receberam os mesmos tratamentos. Nenhum dos tratamentos alterou qualquer um dos parâmetros avaliados em animais não exercitados. O protocolo de exercício diminuiu as reservas de glicogênio (hepático e muscular) e de glicose, além de aumentar níveis de lactato. Em animais exercitados, EEPO apresentou um efeito poupador de glicogênio (tanto hepático quanto muscular) e atenuou a queda nos níveis de glicose, de maneira similar ao PQ. Esse efeito poupador de glicogênio pode ser um fator importante para melhora no desempenho de nado, já que a depleção de glicogênio está relacionada com exaustão física. O fato de EEPO prevenir o aumento de lactato induzido pelo exercício corrobora uma diminuição na glicogenólise e/ou utilização de glicose como fonte de energia. Além disso, animais tratados com EEPO mostram aumento nos níveis séricos de NEFA, sugerindo que EEPO pode estimular o metabolismo de lipídeos. Usando-se preferencialmente lipídeos ao invés de glicose como fonte energética, o glicogênio pode ser utilizado em estágios posteriores do exercício, retardando assim o início da fadiga. A queima facilitada de lipídeos durante períodos curtos de exercício tem

vantagens consideráveis para a perda de peso, e é por isso relevante no controle do sobrepeso e obesidade, reconhecidos fatores de risco para inúmeras doenças (MOAYYEDI, 2008; ZALESIN *et al.*, 2008). A utilização preferencial de lipídeos ao invés de glicogênio como substrato energético também já foi descrito com extratos de plantas, por vezes referidas como termogênicas, como *Camellia sinensis* Kuntze e *Trigonella foenum graecum* L. (MURASE *et al.*, 2005, 2006; IKEUCHI *et al.*, 2006), e corroborados aqui para *P. quinquefolium*.

Durante o exercício físico ocorre ruptura de células tanto por causas metabólicas como mecânicas, levando ao extravasamento de enzimas para a corrente sanguínea (BRANCACCIO *et al.*, 2008). O dano muscular induzido pelo exercício foi avaliado pelas medidas de CK e LDH (MASHIKO *et al.* 2004; AN *et al.*, 2006; BRANCACCIO *et al.*, 2007). O exercício induziu aumento de CK e LDH, e este aumento foi significativamente menor em animais tratados com EEPO. Um menor dano muscular associado ao exercício também pode contribuir para o melhor desempenho observado nos animais tratados com o extrato. Além disso, a atividade antioxidante identificada em EEPO (SIQUEIRA *et al.*, 2002, 2004) pode ser fator adicional para melhora do desempenho físico já que durante o exercício ocorre formação de espécies reativas de oxigênio (ROS), relacionadas com a fadiga muscular (REID, 2008). MURASE e col. (2005, 2006) demonstraram que animais tratados com extrato de chá verde tiveram melhor desempenho em exercício quando comparados com o controle. Embora a relação entre antioxidantes e melhora no desempenho físico ainda não esteja totalmente esclarecida, mostrou-se que alguns compostos com atividade antioxidante melhoram o desempenho e previnem a fadiga (NOVELLI, *et al.*, 1990; VINA *et al.*, 2000).

É óbvio que tanto a caracterização dos efeitos antidepressivos e adaptógenos desta espécie, quanto o aprofundamento no esclarecimento dos mecanismos de ação envolvidos, depende da elucidação dos princípios ativos e de sua caracterização estrutural. Esse extrato pode ser considerado como uma plataforma para o desenvolvimento de novas drogas, já que há ao menos três diferentes atividades: nootrópica, antidepressiva e adaptógena. As faixas de dose em que o extrato se mostra ativo sugerem que conjuntos diferentes de princípios ativos sejam reponsáveis pelas

diferentes atividades. Ao mesmo tempo, como em outros casos de planta medicinais incluindo o *Ginkgo biloba*, é provável que um extrato complexo seja mais efetivo que um composto isolado, especialmente considerando a natureza multifatorial das patologias em questão. Ainda entre as perspectivas, embora a droga vegetal seja amplamente utilizada e não se tenha observado sinais claros de toxicidade, mesmo em animais tratados por 21 dias, um estudo toxicológico completo é certamente necessário.

5. CONCLUSÕES

Esse trabalho demonstrou que o extrato etanólico de *P. olacoides* (EEPO) possui atividade tipo antidepressiva em modelos animais consolidados, na literatura científica e no contexto de desenvolvimento de drogas, para identificação e caracterização de drogas antidepressivas. O efeito tipo antidepressivo parece estar relacionado com a modulação dos sistemas noradrenérgico, dopaminérgico e a normalização do eixo HPA.

No contexto de drogas adaptógenas, este trabalho mostrou que EEPO foi capaz de prevenir alterações comportamentais e bioquímicas induzidas por estresse de diferentes naturezas. Um claro efeito antifadiga foi também identificado em EEPO, relacionado a uma mobilização energética mais eficiente concomitante com a proteção ao dano muscular.

Especificamente mostramos que:

- EEPO apresentou efeito tipo antidepressivo nos modelos de nado forçado e suspensão pela cauda;
- o efeito tipo antidepressivo de EEPO nesses modelos parece não ter relação com serotonina, mas ser mediado por receptores β -adrenérgicos e D_1 dopaminérgicos;
- EEPO apresentou efeito tipo antidepressivo no modelo de estresse moderado crônico imprevisível (parâmetros comportamentais e bioquímicos);
- EEPO preveniu a ansiedade e a hiperglicemia induzidas pelo modelo de estresse moderado crônico imprevisível, sugerindo um efeito adaptógeno;
- EEPO aumentou a resistência à hipóxia em camundongos, compatível com atividade adaptógena;

- EEPO apresentou efeito antifadiga, relacionado tanto a uma mobilização energética mais eficiente (preferencialmente de ácidos graxos com efeito poupador de glicogênio) quanto a uma diminuição do dano muscular.

Este trabalho traz subsídios científicos que parecem não só legitimar os usos tradicionais de Marapuama e algumas das alegações do mercado fitoterápico, mas também indicar que cabem investimentos em inovação tecnológica com essa espécie. Pode-se visualizar a produção de fitoterápicos mais qualificados e/ou de novos compostos antidepressivos e/ou úteis no manejo do estresse e do sobrepeso. Essa tese reforça a idéia de que a diversidade vegetal e cultural brasileira pode servir de base para a inovação tecnológica na área de fármacos, o que constitui mais uma razão para que essas sejam preservadas.

6. REFERÊNCIAS

AKISKAL, HS. Mood disorders: Historical Introduction and Conceptual Overview. In: Sadock BJ. and Sadock. AV (Ed.). **Comprehensive Textbook of Psychiatry** Eight edition, Lippincott Williams & Wilkins, Cap. 13.1, p. 1559-1575, 2005.

AN HJ, CHOI HM, PARK HS, HAN JG, LEE EH, PARK YS, UM JY, HONG SH, KIM HM. Oral administration of hot water extracts of *Chlorella vulgaris* increases physical stamina in mice. **Ann Nutr Metab.**, 50(4):380-6, 2006.

ASBERG M, TRÄSKMAN L, THORÉN P. 5-HIAA in the cerebrospinal fluid. A biochemical suicide predictor? **Arch Gen Psychiatry.**, 33(10):1193-7, 1976.

BARDEN, N. Implication of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the psychopathology of depression. **J Psychiatry Neurosci.**, 29(3):185-93, 2004.

BALDESSARINI, R.J. Tratamento farmacológico da depressão e dos transtornos de ansiedade. In: HARDMAN, J.G.; LIMBIRD, L.E. (Ed.). **Goodman & Gilman's. As Bases Farmacológicas da Terapêutica** 11^a ed. MacGraw-Hill, Cap. 17. p. 383-410, 2006.

BARANOV, A.I. Medicinal use of ginseng and related plants in the Soviet Union: recent trends in the soviet literature. **J Ethnopharmacol.**, 6: 339-353, 1982.

BERTON O, NESTLER EJ. New approaches to antidepressant drug discovery: beyond monoamines. **Nat Rev Neurosci.**, 7(2):137-51, 2006.

BHATTACHARYA SK, MURUGANANDAM AV. Adaptogenic activity of *Withania somnifera*: an experimental study using a rat model of chronic stress. **Pharmacol Biochem Behav.**, 75(3):547-55, 2003.

BISSETTE, G., KLIMEK, V., PAN, J., STOCKMEIER, C., ORDWAY, G., 2003. Elevated concentrations of CRH in the locus coeruleus of depressed subjects. **Neuropsychopharmacology.**, 28(7):1328-35.

BLAZER, D.G., KESSLER, R.C., MCGONAGLE, K.A., AND SWARTZ, M.S. The prevalence and distribution of major depression in a national community sample: the National Comorbidity Survey. **Am J Psychiatry.**, 151, 979-986, 1994.

BRANCACCIO, P, MAFFULLI, N, BUONAURO, R, LIMONGELLI, FM. Serum enzyme monitoring in sports medicine. **Clin Sports Med.**, 27:1-18, 2008.

BRANCACCIO, P, MAFFULLI, N, LIMONGELLI, FM. Creatine kinase monitoring in sport medicine. **Br Med Bull.**, 81-82:209-230, 2007.

BREKHMEN, I.I., DARDYMOV, I.V. New substances of plant origin which increase nonspecific resistance. **Ann Rev Pharmacol.**, 8:419-430, 1969.

- BREMNER JD. Stress and brain atrophy. **CNS Neurol Disord Drug Targets.**, 5(5):503-12, 2006.
- BUCKLEY, PF, BUCHANAN, RW, TAMMINGA, CA, SCHULZ, SC. Schizophrenia research: a progress report, summarizing proceedings of the 1999 International Congress on Schizophrenia Research. **Schizophr Bull.**, 26 (2):411-9, 2000.
- CABRAL, S, AGRA, MF. **Olacaceae medicinais do Brasil, Parte I: Ximenea americana L & Ptychopetalum olacoides Benth.** Anais do XIV Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, Florianópolis, Santa Catarina, p.55, 1996.
- CARLINI, EA. **Efeito adaptógeno ou resistógeno de algumas plantas.** In, Buchillet D, editor. Medicinas tradicionais e medicina ocidental na Amazônia. Belém. Edições CEJUP; p.45-59, 1989.
- CARRASCO, GA, VAN DE KAR, LD. Neuroendocrine pharmacology of stress. **Eur J Pharmacol.**, 463(1-3):235-72, 2003.
- CHARNEY, DS. Psychobiological mechanisms of resilience and vulnerability: implications for successful adaptation to extreme stress. **Am J Psychiatry.**, Feb;161(2):195-216, 2004.
- CHEN, B, DOWLATSHAHI, D, MACQUEEN, GM, WANG, JF, YOUNG, LT. Increased hippocampal BDNF immunoreactivity in subjects treated with antidepressant medication. **Biol Psychiatry.**, 50, 260–265, 2001.
- CLAGHORN, JL, KIEV, A, RICKELS, K, SMITH, WT, DUNBAR, GC. Paroxetine versus placebo: a double-blind comparison in depressed patients. **J Clin Psychiatry.**, Dec;53(12):434-8, 1992.
- COSTA & SILVA, JA. Overview of the field. **Metabol Clin Experim.**, 54 (Supplement 1) 5-9, 2005.
- DA SILVA, AL, PIATO, AL, BARDINI, S, NETTO, CA, NUNES, DS, ELISABETSKY, E. Memory retrieval improvement by Ptychopetalum olacoides in young and aging mice. **J Etnopharmacol.**, 95(2-3):199-203, 2004.
- DA SILVA, AL, PIATO, AL, FERREIRA, JG, MARTINS, BS, NUNES, DS, ELISABETSKY, E. Promnesic effects of Ptychopetalum olacoides in aversive and non-aversive learning paradigms. **J Ethnopharmacol.**, 12; 109(3): 449-57, 2007.
- DA SILVA, AL, FERREIRA, JG, DA SILVA, MARTINS B, OLIVEIRA, S, MAI, N, NUNES, DS, ELISABETSKY, E. Serotonin receptors contribute to the promnesic effects of P. olacoides (Marapuama). **Physiol Behav.**, Sep 3;95(1-2):88-92, 2008.

DA SILVA, AL, SILVA, MARTINS B, LINCK, VDE M, HERRMANN, AP, MAI, N, NUNES, DS, ELISABETSKY, E. MK801- and scopolamine-induced amnesias are reversed by an Amazonian herbal locally used as a "brain tonic". **Psychopharmacology** (Berl)., Jan;202(1-3):165-72, 2009.

D'AQUILA, PS, COLLU, M, PANI, L, GESSA, GL, SERRA, G. Antidepressant-like effect of selective D1 receptor agonist in the behavioural despair animal model of depression. **Eur J Pharmacol.**, 262:107-111, 1994.

D' AQUILA, PS, COLLU, M, GESSA, GL, SERRA, G. The role of dopamine in the mechanism of action of antidepressant drugs. **Eur J Pharmacol.**, 405: 365-73, 2000.

DADAYAN, MA, PANOSSIAN, AG. Effects of cucurbitacin R diglucoside on steroidogenesis and arachidonic acid metabolism in stress, In: **Lipid peroxidation in normal state and pathogenesis of some diseases**. Hayastan Erevan, 85-88, 1987.

DAVYDOV, M, KRIKORIAN, AD. *Eleutherococcus senticosus* (Rupr. & Maxim.) Maxim. (Araliaceae) as an adaptógeno: a closer look. **J Ethnopharmacol.**, 72:345-393, 2000.

DHULEY, NJ. Adaptogenic e Cardioprotective action of ashwagandha in rats and frogs. **J Ethnopharmacol.**, 70:57-63, 2000.

DHULEY, JN. Nootropic-like effect of ashwagandha (*Withania somnifera* L.) in mice. **Phytoh Res.**, 15:524-528, 2001.

DUKE, J. A. **Handbook of Phytochemical Constituents of GRAS Herbs and Other Economic Plants**. CRC Press, Boca Raton, FL, 654p, 1992.

DUMAN, RS. Role of neurotrophic factors in the etiology and treatment of mood disorders. **Neuromolecular Med.**, 5(1):11-25, 2004.

DUNLOP, BW, NEMEROFF, CB. The role of dopamine in the pathophysiology of depression. **Arch Gen Psychiatry.**, 64(3):327-37, 2007.

ELENKOV, IJ, CHROUSOS, GP. Stress system--organization, physiology and immunoregulation. **Neuroimmunomodulation.**,13(5-6):257-67, 2006.

ELISABETSKY, E, FIGUEIREDO, W, OLIVEIRA, G. Traditional Amazonian nerve tonics as antidepressant agents: *Chaunochiton kappleri*: a case study. **Herbs Spices Med Plants.**, 1, 125-161, 1992.

ENNA, SJ, KARBON, EW, DUMAN, RS. GABA-B agonist and imipramine-induced modifications in rat brain beta-adrenergic receptor binding and function. In: **GABA and Mood Disorders: Experimental and Clinical Research**. Edited by Bartholini G, Lloyd KG, Morselli PL. New York, Raven, pp 23-49, 1986.

FABRE, L, BIRKHIMER, LJ, ZABORNY, BA, WONG, LF, KAPIK, BM. Fluvoxamine versus imipramine and placebo: a double-blind comparison in depressed patients. **Int Clin Psychopharmacol.**, Jun;11(2):119-27, 1996.

FDA. **Notice of Proposed Rulemaking, Federal Register**, April 29, 1998.

FICHTER, MM, NARROW, WE, ROPER, MT, REHM, J, ELTON, M, RAE, DS, LOCKE, BZ, REGIER, DA. Prevalence of mental illness in Germany and the United States. Comparison of the Upper Bavarian Study and the Epidemiologic Catchment Area Program. **J Nerv Ment Dis.**, Oct;184(10):598-606, 1996.

FLORES, BH, MUSSELMAN, DL, DEBATTISTA, C, GARLW, SJ, SCHATZBERG, AF, NEMEROFF, CG. Biology of Mood Disorders. In: Schatzberg, MD & Nemeroff CB. (Ed.). **Textbook of Psychopharmacology** Third edition, American Psychiatric Publishing, Inc, Cap. 45, p. 717-763, 2004.

FONSECA, CA. Plantas Afrodizíacas. Iao Livraria & Editora Ltda, Brasil, p.32, 1981.

GAMBARANA, C, GHIGLIERI, O, TAGLIAMONTE, A, DALESSANDRO, N, DE MONTIS, MG. Crucial Role of D1 dopamine receptor in mediating the antidepressant effect of imipramine. **Pharmacol Biochem Behav.**, 2: 147-51, 1995.

GEORGIEV, V, STANCHEVA, S, GETOVA, D, ALOVA, L, OPITZ, M. Effects of angiotensin II on brain monoamines in nonhypoxic and hypoxic mice. **Pharmacol Biochem Behav.**, 50:457-461, 1995.

GILLESPIE, CF, NEMEROFF, CB. Hypercortisolemia and depression. **Psychosom Med.**, 67 Suppl 1:S26-8, 2005.

GILLS, CN. Panax ginseng: a nitric oxide like? **Biochem Pharmacol.**, 54: 1-8, 1997.

GOLDBERG, DP, LECRUBIER, Y. Form and frequency of mental disorders across centres. In: Üstün TB, Sartorius N, eds. **Mental illness in general health care: an international study**. Chichester, John Wiley & Sons on behalf of WHO: 323–334, 1995.

IKEUCHI, M, YAMAGUCHI, K, KOYAMA, T, SONO, Y, YAZAWA, K. Effects of fenugreek seeds (*Trigonella foenum graecum*) extract on endurance capacity in mice. **J Nutr Sci Vitaminol.**, 52:287-292, 2006.

JANOWSKY, DS, EL-YOUSEF, MK, DAVIS, JM, SEKERKE, HJ. A cholinergic-adrenergic hypothesis of mania and depression. **Lancet.** 23;2(7778):632-5, 1972.

JOCA, SR, FERREIRA, FR, GUIMARÃES, FS. Modulation of stress consequences by hippocampal monoaminergic, glutamatergic and nitrenergic neurotransmitter systems. **Stress.**, 10(3):227-49, 2007.

KENDLER, KS, THORNTON, LM, GARDNER, CO. Genetic risk, number of previous depressive episodes, and stressful life events in predicting onset of major depression. **Am J Psychiatry.**, 158(4):582-6, 2001.

KIM, H, KIM, K, OH, K. Ginseng total saponin inhibits nicotine-induced hyperactivity and conditioned preference in mice. **J Ethnopharmacol.**, 66: 83-90, 1999.

KRISHNAN, V, NESTLER, EJ. The molecular neurobiology of depression. **Nature.**, 16;455(7215):894-902, 2008.

LAYER, RT, POPIK, P, OLDS, T, SKOLNICK, P. Antidepressant-like actions of the polyamine site NMDA antagonist, eliprodil (SL-82.0715). **Pharmacol Biochem Behav.**, 52:621-627, 1995.

LÉPINE JP, CAILLARD V, BISSERBE JC, TROY S, HOTTON JM, BOYER P. A randomized, placebo-controlled trial of sertraline for prophylactic treatment of highly recurrent major depressive disorder. **Am J Psychiatry.** 161(5):836-42, 2004.

LIMA, IM, SAMAIA, HB, VALLADA-FILHO, HP. Genética. In: Lafer B, Almeida OP, Fráguas Jr. R, Miguel EC (eds). **Depressão no ciclo de vida.** São Paulo, ArtMed, pp. 56-65, 2000.

MALKESMAN, O, BRAW, Y, WELLER, A. Assessment of antidepressant and anxiolytic properties of NK1 antagonists and substance P in Wistar Kyoto rats. **Physiol Behav.**, 16;90(4):619-25, 2007.

MASHIKO, T, UMEDA, T, NAKAJI, S, SUGAWARA, K. Effects of exercise on the physical condition of college rugby players during summer training camp. **Br J Sports Med.**, 38:186-90, 2004.

McEWEN, BS, WINGFIELD, JC. The concept of allostasis in biology and biomedicine. **Horm Behav.**, 43(1):2-15, 2003.

McEWEN, BS. Glucocorticoids, depression, and mood disorders: structural remodeling in the brain. **Metabolism.**, 54(5 Suppl 1):20-3, 2005.

McEWEN, BS. Physiology and neurobiology of stress and adaptation: central role of the brain. **Physiol Rev.**, 87(3):873-904, 2007.

McEWEN, BS. Central effects of stress hormones in health and disease: Understanding the protective and damaging effects of stress and stress mediators. **Eur J Pharmacol.**, 583:174-185, 2008.

McKINNEY, WT. Animal models of depression: an overview. **Psychiatr Dev.**, 2(2):77-96, 1984.

MELONI, D, GAMBARANA, C, DE MONTIS, MG, DAL PRA, P, TADDEI, I, TAGLIAMONTE, A. Dizocilpine antagonizes the effect of chronic imipramine on learned helplessness in rats. **Pharmacol Biochem Behav.**, 46:423-426, 1993.

MENDES, FR, CARLINI, EA. Brazilian plants as possible adaptogens: an ethnopharmacological survey of books edited in Brazil. **J Ethnopharmacol.**, 109:493-500, 2007.

MILLER, HL, EKSTROM, RD, MASON, GA, LYDIARD, RB, GOLDEN, RN. Noradrenergic function and clinical outcome in antidepressant pharmacotherapy. **Neuropsychopharmacology** 24(6): 617-23, 2001.

MITANI, H, SHIRAYAMA, Y, YAMADA, T, MAEDA, K, ASHBY, CR JR, KAWAHARA, R. Correlation between plasma levels of glutamate, alanine and serine with severity of depression. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.**, 30(6):1155-8, 2006.

MOAYYEDI, P. The epidemiology of obesity and gastrointestinal and other diseases: an overview. **Dig Dis Sci.**, 53(9):2293-9, 2008.

MONTEJO-GONZALEZ, AL, LLORCA, G, IZQUIERDO, JA, LEDESMA, A, BOUSONO, M, CALCEDO, A, CARRASCO, JL, CIUDAD, J, DANIEL, E, DE LA GANDARA, J, DERECHO, J, FRANCO, M, GOMEZ, MJ, MACIAS, JA, MARTIN, T, PEREZ, V, SANCHEZ, JM, SANCHEZ, S, VICENS, E. SSRI-induced sexual dysfunction: fluoxetine, paroxetine, sertraline, and fluvoxamine in a prospective, multicenter, and descriptive clinical study of 344 patients. **J Sex Marital Ther Fall.**, 23(3):176-94, 1997.

MONTRUCCHIO, DP, MIGUEL, OG, MIGUEL, MD, CÚNICO, MM, SILVA, VC, DA, KERBER, VA. Constituintes químicos de *Ptychopetalum olacoides*. Trabalho apresentado no **XVII Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil**. Centro de Eventos do Pantanal, Cuiabá, MT. Cd room do Congresso, 2002.

MORIN, D, HAUET, T, SPEDDING, M, TILLEMENT, J. Mitochondria as target for antiischemic drugs. **Adv Drug Deliv Rev.**, 49(1-2):151-74, 2001.

MURASE, T, HARAMIZU, S, SHIMOTOYODOME, A, NAGASAWA, A, TOKIMITSU, I. Green tea extract improves endurance capacity and increases muscle lipid oxidation in mice. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.**, 288:R708-715, 2005.

MURASE, T, HARAMIZU, S, SHIMOTOYODOME, A, TOKIMITSU, I, HASE, T. Green tea extract improves running endurance in mice by stimulating lipid utilization during exercise. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.**, 290:R1550-1556, 2006.

MURPHY, SL. Deaths: Final data for 1998. **National Vital Statistics Reports (CDC)** 48, 1-106, 2000.

- MURRAY CJ, LOPEZ AD. Evidence-based health policy--lessons from the Global Burden of Disease Study. **Science.**, 1;274(5288):740-3, 1996.
- NESTLER, E, BARROT M, DILEONE RJ, EISCH AJ, GOLD SJ, MONTEGGIA, LM. Neurobiology of depression. **Neuron** 34:13–25, 2002.
- NOCERINO, E, AMATO, M, IZZO, A. The aphrodisiac and adaptogenic properties of ginseng. **Fitoterapia**, 71: S1-S5, 2000.
- NOVELLI GP, BRACCIOTTI G, FALSINI S. Spin-trappers and vitamin E prolong endurance to muscle fatigue in mice. *Free Radic Biol Med.*, 8(1):9-13, 1990.
- OWENS, MJ, MORGAN, WN, PLOTT, SJ, NEMEROFF, CB. Neurotransmitter receptor and transporter binding profile of antidepressants and their metabolites. **J Pharmacol Exp Ther.**, 283(3):1305-22, 1997.
- PANOSSIAN, AG, DADAYAN, MA, GABRIELIAN, ES. Cucurbitacin R glucoside as a regulator of steroidogenesis and production of prostaglandin E2 – a specific modulator of HPA cortex system. **Bull Exp Biol Med.**, 53:456-457, 1987.
- PANOSSIAN, AG, GABRIELIAN, E, WAGNER, H. Plant adaptogens II Bryonia as an adaptógeno. **Phytomedicine** 4(1): 83-97, 1997.
- PANOSSIAN, AG, WIKMAN, G, WAGNER, H. Plant adaptogens III. Earlier and more recent aspects and concepts on their mode of action. **Phytomedicine** 6(4): 287-300, 1999a.
- PANOSSIAN, AG, OGANESSIAN, AS, AMBARTSUMIAN, M, GABRIELIAN, ES, WAGNER, H, WIKMAN, G. Effect of heavy physical exercise and adaptogens on nitric oxide content in human saliva. **Phytomedicine** 6 (1): 17-26, 1999b.
- PANOSSIAN, A, WAGNER, H. Stimulating effect of adaptogens: an overview with particular reference to their efficacy following single dose administration. **Phytother Res.**, 19(10):819-38, 2005.
- PANOSSIAN, A, WIKMAN, G. Effect of adaptogens on the central nervous system. **Arquivos Brasileiros de Fitomedicina Científica** 3 (1), 2005.
- PAPAKOSTAS, GI, FAVA, M. A meta-analysis of clinical trials comparing milnacipran, a serotonin--norepinephrine reuptake inhibitor, with a selective serotonin reuptake inhibitor for the treatment of major depressive disorder. **Eur Neuropsychopharmacology** 17(1):32-6, 2007.
- PAPAKOSTAS, GI, THASE, ME, FAVA, M, NELSON, JC, SHELTON, RC. Are antidepressant drugs that combine serotonergic and noradrenergic mechanisms of action more effective than the selective serotonin reuptake inhibitors in treating major

depressive disorder? A meta-analysis of studies of newer agents. **Biol Psychiatry.**, 1;62(11):1217-27, 2007.

PAPP, M, MORYL, E. Antidepressant activity of non-competitive and competitive NMDA receptor antagonists in a chronic mild stress model of depression. **Eur J Pharmacol.**, 263:1-7, 1994.

PERKOLT T. Heil und Nutzpflanzen Brasiliens. **Ber Dtsch Pharm Ges** 11:40-7, 1901.

PERRY, EK, PICKERING, AT, WANG, WW, HOUGHTON, PJ, PERRY, NL. Medicinal plants and Alzheimer's disease: from ethnobotany to phytotherapy. **J Pharm Pharmacol.**, 51: 527-534, 1999.

RAI, D, BHATIA, G, PALIT, G, PAL, R, SINGH, S, SINGH, HK. Adaptogenic effect of *Bacopa monniera* (Brahmi). **Pharmacol Biochem Behav.**, 75: 823-830, 2003.

RAISON, CL, CAPURON, L, MILLER, AH. Cytokines sing the blues: inflammation and the pathogenesis of depression. **Trends Immunol.**, 27(1):24-31, 2006.

REGE, NN, THATTE, UM, DHANUKAR, SA. Adaptogenic properties of six rasayana herbs used in Ayurvedic medicine. **Phytother Res.**, 13:275-291, 1999.

REID, MB. Free radicals and muscle fatigue: Of ROS, canaries, and the IOC. **Free Radic Biol Med.**, 44:169-179, 2008.

SANACORA, G, ZARATE, CA, KRYSTAL, JH, MANJI, HK. Targeting the glutamatergic system to develop novel, improved therapeutics for mood disorders. **Nat Rev Drug Discov.**, 7(5):426-37, 2008.

SANGIRARDI, J. **Plantas Eróticas**. Editora Nórdica Ltda. Brasil, 217, 1981.

SCHIEPERS, OJ, WICHERS, MC, MAES, M. Cytokines and major depression. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.** 29(2):201-17, 2005.

SCHILDKRAUT, JJ. The catecholamine hypothesis of affective disorders: a review of supporting evidence. **Am J Psychiatry.**, 122(5):509-22, 1965.

SELYE, H. A Syndrome produced by Diverse Noxious Agents. **Nature** 138:32, 1936.

SHELIN, Y. I. Neuroimaging studies of mood disorder effects on the brain. **Biol Psychiatry.**, 54, 338-352, 2003.

SINGH, B, CHANDAN, BK, SHARMA, N, SINGH, S, KHAJURIA, A, GUPTA, DK. Adaptogenic activity of glyco-peptido-lipid fraction from the alcoholic extract of *Trichopus zeylanicus* Gaerten (part II). **Phytomedicine** 12(6-7):468-81, 2005.

SINGH, B, GUPTA, DK, CHANDAN, BK. Adaptogenic activity of a glyco-peptido-lipid fraction from the alcoholic extract of *Trichopus zeylanicus* Gaertn. **Phytomedicine** 8(4):283-91, 2001.

SIQUEIRA, IR, LARA, DR, SILVA, D, GAIESKI, FS, NUNES, DS, ELISABETSKY, E. Psychopharmacological properties of *Ptychopetalum olacoides* BENTHAM (Olacaceae). **Phar Biol.**, 36: 327-34, 1998.

SIQUEIRA, IR, CORDOVA, CAS, CRECZYNSKI-PASA, TB, ELISABETSKY, E, NUNES, DS, NETTO, CA. Antioxidant action of an ethanol extract of *Ptychopetalum olacoides*. **Phar Biol.**, 40 (5): 374-379, 2002.

SIQUEIRA, IR, FOCHESTATTO, C, DA SILVA, AL, NUNES, DS, BATTASTINI, AM, NETTO, CA, Elisabetsky E. *Ptychopetalum olacoides*, a traditional Amazonian "nerve tonic", possesses anticholinesterase activity. **Pharmacol Biochem Behav.**, 75(3):645-50, 2003.

SIQUEIRA, IR, CIMAROSTI, H, FOCHESTATTO, C, NUNES, DS, SALBEGO, C, ELISABETSKY, E, NETTO, CA. Neuroprotective effects of *Ptychopetalum olacoides* Bentham (Olacaceae) on oxygen and glucose deprivation induced damage in rat hippocampal slices. **Life Sci.**, 75: 1897-906, 2004.

SIQUEIRA, IR, FOCHESTATTO, C, TORRES, IL, DA SILVA, AL, NUNES, DS, ELISABETSKY, E, NETTO, CA. Antioxidant activities of *Ptychopetalum olacoides* ("muirapuama") in mice brain. **Phytomedicine** 14(11):763-769, 2007.

SLEUMER, HO. *Flora Neotropica*. New York, The New York Botanical Garden, 159p, 1984.

SPASOV, AA, WIKMAN, GK, MANDRIKOV, VB, MIRONOVA, IA, NEUMOIN, VV. A double-blind, placebo-controlled pilot study of the stimulating and adaptogenic effect of *Rhodiola rosea* SHR-5 extract on the fatigue of students caused by stress during an examination period with a repeated low-dose regimen. **Phytomedicine** 7(2):85-9, 2000.

STEINMETZ, E. Muira puama (potency wood). **Quarterly Journal of crude Drug Reserch** 2: 229-232, 1962.

STERLING, P, EYER, J. **Allostasis: a new paradigm to explain arousal pathology**. In: Fisher, S., Reason, J. (Eds.), *Handbook of Life Stress, Cognition and Health*, Wiley, New York, pp. 629–649, 1988.

STOUT, SC, OWENS, MJ, NEMEROFF, CB. Neurokinin(1) receptor antagonists as potential antidepressants. **Annu Rev Pharmacol Toxicol.**, 41:877-906, 2001.

SULLIVAN, PF, NEALE, MC, KENDLER, KS. Genetic epidemiology of major depression: review and meta analysis. **Am. J. Psychiatry.**, 157, 1552–1562, 2000.

SWAAB, DF, BAO, AM, LUCASSEN, PJ. The stress system in the human brain in depression and neurodegeneration. **Ageing Res Rev.**, 4(2):141-94, 2005.

TANG W, KUBO M, HARADA K, HIOKI H, FUKUYAMA Y. Novel NGF-potentiating diterpenoids from a Brazilian medicinal plant, *Ptychopetalum olacoides*. *Bioorg Med Chem Lett.* 19(3):882-6, 2009.

THASE, ME. Mood disorders: Historical Introduction and Conceptual Overview. In: Sadock BJ. and Sadock. AV (Ed.). **Comprehensive Textbook of Psychiatry** Eight edition, Lippincott Williams & Wilkins, Cap. 13.4, p. 1594-1603, 2005.

THOMSON, F, CRAIGHEAD, M. Innovative approaches for the treatment of depression: targeting the HPA axis. **Neurochem Res.**, 33(4):691-707, 2008.

TOMODA, A, MORI, K, KIMURA, M, TAKAHASHI, T, KITAMURA, T. One-year prevalence and incidence of depression among first-year university students in Japan: a preliminary study. **Psychiatry Clin. Neurosci.**, 54, 583–588, 2000.

TSIGOS, C, CHROUSOS, GP. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, neuroendocrine factors and stress. **J Psychosom Res.**, 53:865-871, 2002.

VIÑA J, GOMEZ-CABRERA MC, LLORET A, MARQUEZ R, MIÑANA JB, PALLARDÓ FV, SASTRE J. Free radicals in exhaustive physical exercise: mechanism of production, and protection by antioxidants. *IUBMB Life.*, 50(4-5):271-7, 2000.

VIS, PM, VAN BAARDEWIJK, M, EINARSON, TR. Duloxetine and venlafaxine-XR in the treatment of major depressive disorder: a meta-analysis of randomized clinical trials. **Ann Pharmacother.**, 39(11):1798-807, 2005.

WAGNER, H, NÖRR, H, WINTERHOFF, H. Plant adaptogens. **Phytomedicine** 1:63-76, 1994.

WANNMACHER, L. Fármacos Usados nos Distúrbios Afetivos. In: **Farmacologia Clínica- Fundamentos da Terapia Racional.** 3a ed. Guanabara Koogan, Cap. 47. p. 587-604, 2004.

WEISSMAN, MM, KLERMAN, GL. Depression: current understanding and changing trends. **Annu Rev Public Health** 13:319-39, 1992.

WILNER, P. Animal Models of depression: an overview. **Pharmac Ther.**, 45: 425-455, 1990.

WILNER, P, HALE, AS, ARGYROPOULOS, S. Dopaminergic mechanism of antidepressant action in depressed patients. **J Affect Disord.**, 86(1):37-45, 2005.

WILLNER P. Chronic mild stress (CMS) revisited: consistency and behavioural-neurobiological concordance in the effects of CMS. **Neuropsychobiology**. 52(2):90-110, 2005.

YAMADA, J, SUGIMOTO, Y, YAMADA, S. Involvement of dopamine receptors in the anti-immobility effects of dopamine re-uptake inhibitors in the forced swimming test. **Eur J Pharmacol.**, 504: 207-11, 2004.

YOUNGKEN, HW. Muira-puama. **Am J Pharmacol.**, 625-627, 1921.

ZALESIN, KC, FRANKLIN, BA, MILLER, WM, PETERSON, ED, MCCULLOUGH, PA. Impact of obesity on cardiovascular disease. **Endocrinol Metab Clin North Am**. 37(3):663-84, 2008.

ZARATE, CA JR, SINGH, JB, CARLSON, PJ, BRUTSCHE, NE, AMELI, R, LUCKENBAUGH, DA, CHARNEY, DS, MANJI, HK. A randomized trial of an N-methyl-D-aspartate antagonist in treatment-resistant major depression. **Arch Gen Psychiatry.**, 63(8):856-64, 2006.

ZHONG, Y, NISHIRO, H, UWANO, T, TAMURA, R, KAWANISHI, K, ONO, T. Red ginseng ameliorated placed navigation deficits in young rats with hippocampal lesions and aged rats. **Physiol Behav.**, 69: 511-525, 2000.

7. ANEXO – Carta de aprovação do comitê de ética em pesquisa da UFRGS.



PRÓ-REITORIA DE PESQUISA
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
CARTA DE APROVAÇÃO

pro.pesq

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Sul analisou o projeto:

Número : 2006543

Título : Estudo das Atividades antidepressivas e Adaptogênica de *Ptychopetalum olacoides* BENTHAM (OLACACEAE)

Pesquisador (es) :

<u>NOME</u>	<u>PARTICIPAÇÃO</u>	<u>EMAIL</u>	<u>FONE</u>
ELAINE ELISABETSKY	PESQ RESPONSÁVEL	elisasky@vortex.ufrgs.br	33163569
ÂNGELO LUIS STAPASSOLI PIATO	PESQUISADOR	angelopiato@yahoo.com.br	
LUCAS POLO RIZZON	PESQUISADOR	lucas.polo@ufrgs.br	

O mesmo foi aprovado , com recomendações, especificadas abaixo, pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFRGS, na reunião nº 3 , ata nº 69 , de 13/04/2006 .

Porto Alegre, terça-feira, 6 de junho de 2006

LUIZ CARLOS BOMBASSARO

Coordenador do CEP-UFRGS