



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

MARIA DO CARMO DE OLIVEIRA CITÓ

ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS, NEUROQUÍMICAS E METABÓLICAS
CAUSADAS PELO USO AGUDO E DOSES REPETIDAS DE *HOODIA GORDONII*
EM ROEDORES

FORTALEZA
2014

MARIA DO CARMO DE OLIVEIRA CITÓ

ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS, NEUROQUÍMICAS E METABÓLICAS
CAUSADAS PELO USO AGUDO E DOSES REPETIDAS DE *HOODIA GORDONII* EM
ROEDORES

Tese submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Farmacologia.

Orientador: Profa Dra Francisca Cléa Florenço de Sousa

FORTALEZA
2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências da Saúde

C528a

Citó, Maria do Carmo de Oliveira.

Alterações comportamentais, neuroquímicas e metabólicas causadas pelo uso agudo e doses repetidas de *hoodia gordonii* em roedores / Maria do Carmo de Oliveira Citó. – 2014.
170 f. : il., enc. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Doutorado em Farmacologia, Fortaleza, 2014.

Área de Concentração: Farmacologia.

Orientação: Profa. Dra. Francisca Cléa Florenço de Sousa.

1. Anorexia. 2. Transtornos de Adaptação. 3. Ansiedade. 4. Monoaminas Biogênicas. I. Título.

CDD 615.32372

MARIA DO CARMO DE OLIVEIRA CITÓ

"ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS, NEUROQUÍMICAS E METABÓLICAS CAUSADAS PELO USO AGUDO E DE DOSES REPETIDAS DE *HOODIA GORDONII* EM ROEDORES"

Tese de Doutorado em Farmacologia submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para obtenção do Grau de Doutor(a) em Farmacologia.

Aprovada em: 14 de agosto de 2014.

Profa. Dra. Francisca Cléa Florenço de Sousa
Universidade Federal do Ceará – UFC
(Orientadora)

Profa. Dra. Marta Maria de França Fonteles
Universidade Federal do Ceará – UFC

Profa. Dra. Renata de Sousa Alves
Universidade Federal do Ceará – UFC

Profa. Dra. Edna Maria Camelo Chaves
Universidade Estadual do Ceará – UECE

Prof. Dr. Cícero Francisco Bezerra Felipe
Universidade Federal da Paraíba – UFPB.

À Deus,

aos meus familiares,

aos meus amigos.

AGRADECIMENTOS

À **Deus**, por ter me dado força e serenidade durante esta longa caminhada.

À minha orientadora e amiga **Profa. Dra. Francisca Cléa Florenço de Sousa**, pelos conhecimentos adquiridos neste tempo, pela dedicação e disponibilidade em me ajudar sempre que necessário. Por depositar inteira confiança em meu ser.

Aos professores **Dra. Marta Maria de França Fonteles, Dr Cícero Francisco Bezerra Felipe, Dra Edna Maria Camelo Chaves e Dra Renata de Sousa Alves**, pela gentileza de ler este trabalho, proporcionando sugestões e discussões que servirão para crescimento, aprendizado e incentivo à pesquisa.

Aos professores **Dr Jeferson Falcão do Amaral e Dra Maria Izabel Gomes Silva** pela disponibilidade e parceria durante todo este tempo,

Ao prof Ms **Aislan Pereira Lira de Abreu** por ter nos fornecido a substância para estudo,

Às minhas amigas de pós-graduação **Luciana Kelly Ximenes dos Santos, Mariana Lima Fernandes, Francisca Helvira Cavalcante Melo**, pelo estímulo, competência, ensinamentos, momentos de alegria durante todo o percurso e dedicação à pesquisa.

À minha amiga e co-orientadora **Maria Izabel Gomes Silva**, pelo exemplo de pesquisadora, e companheira em muitos momentos.

Aos professores do Laboratório de Neurofarmacologia da UFC, **Dra Daniele Silveira Macêdo, Dra. Glauce Barroso, Dra. Silvânia Maria Mendes de Vasconcelos**, pela colaboração, incentivo e pela confiança depositada nos alunos.

Aos professores do curso de pós graduação em especial **Dra. Helena Serra Azul, Dra. Nylane Alencar, Dr Pedro Magalhães, Dr Marcellus Loiolla, Gisella Camarão**, pelos conhecimentos transmitidos e apoio fornecido aos alunos da pós graduação.

Aos laboratórios parceiros (**Oncologia experimental; Histologia; Bioquímica**), os professores destes laboratórios (**Dr Odorico Moraes, Dra Cláudia do Ó Pessoa, Dra Gerly Anne de Castro Brito, Dr Pedro Torquato, Dra Maria Goretti Rodrigues de Queiroz**), e os alunos integrantes (**Bruno Marques, Thamires Morais**) que contribuíram com a realização de alguns experimentos.

Aos meus amigos de pós graduação **Giuliana Cavalcante, Iris Cristina, Edith Teles, Nayrton Flávio, Emiliano Rios, Marília Leite, Alyne Mara, Leonardo Freire, Mariana Feitosa, Auriana, Fernando, Thiciane, Eduardo, Márcia Calheiros**, que estiveram presentes em vários momentos, pela dedicação e amizade e por estarem sempre dispostos a ajudar. E **Arnaldo**, que é responsável pelo HPLC, por ter passado minhas amostras.

Aos bolsistas do laboratório de Neurofarmacologia, **Iardja Stéfanie, Priscila de Sousa, Laura**, que estão sempre dispostas a ajudar.

À CAPES, FUNCAp e CNPq pelo apoio financeiro importantíssimo, na pesquisa

Aos integrantes do projeto de drogas de abuso, pelo apoio e incentivo

Às técnicas do laboratório Lucilene e Vilanir, pela companhia constante.

À todos os alunos de laboratório e da pós graduação que estiveram presentes neste período de intenso aprendizado.

Aos funcionários do Biotério que forneceram os animais para o estudo.

A todos os funcionários do Departamento de Farmacologia da UFC.

Aos meus familiares, pelo apoio, dedicação, e compreensão nos momentos de minha ausência.

Aos meus amigos pelo apoio e companheirismo.

*Enfim agradeço a todos aqueles que dispuseram
um pouco do bem mais precioso: o tempo*

“Sê humilde para evitar o orgulho, mas voa alto para alcançar a sabedoria.” (Santo Agostinho)

RESUMO

Hoodia gordonii passou a ser consumida há séculos, com o intuito de promover uma redução do apetite e da ingestão de água e comida, e até os dias atuais é utilizada para este fim, em diversos países. O presente estudo buscou investigar possíveis alterações comportamentais e metabólicas em roedores tratados com *Hoodia gordonii*, em diferentes períodos de tratamento. Para avaliar o peso corporal do animal, ratos foram pesados diariamente, no período do tratamento e mensurado o peso, a ingestão de água e comida. Para investigar as alterações comportamentais (ansiedade e depressão) e neuroquímicas, os camundongos foram submetidos aos tratamentos de 1, 8 e 15 dias com *Hoodia gordonii* por via oral (25 e 50mg/kg), e em seguida realizados os testes comportamentais de Labirinto em Cruz Elevado (LCE), Campo Aberto (CA) e outros grupos de camundongos foram submetidos ao teste do Nado Forçado (NF). Com intuito de investigar o envolvimento com o sistema monoaminérgico, no efeito de *H. gordonii* sobre a depressão, os camundongos foram pré-tratados com antagonistas específicos para receptores de dopamina D₁ e D₂, de noradrenalina α_1 e α_2 , de serotonina 5HT_{1A}, 5HT_{2A/2C}, 5HT_{3A} no teste do nado forçado. Além disso, outros grupos de camundongos foram pré-tratados com *Hoodia gordonii* por 1,8 e 15 dias e uma hora após tiveram o corpo estriado removido para análise da concentração de monoaminas, através da técnica de HPLC e o hipocampo para realização de experimentos de estresse oxidativo, por quantificação dos níveis de glutathiona reduzida, atividade da enzima catalase, níveis de nitrito/nitrato e malonildialdeído. Foi realizado também teste de citotoxicidade pelo método colorimétrico do MTT e estudo de genotoxicidade (DNA) em linfócitos humanos. Os resultados revelaram que o extrato reduziu o peso corporal dos animais, bem como a ingestão de água e comida. Nos testes comportamentais, observou-se um possível efeito ansiogênico no LCE. No teste do campo aberto ocorreu uma redução da atividade locomotora no 15º dia de tratamento e no teste do nado forçado um efeito antidepressivo-símile nos três tempos de tratamento, observado pela redução do tempo de imobilidade. Este efeito antidepressivo foi revertido com o pré-tratamento de antagonistas noradrenérgicos, serotoninérgicos e dopaminérgicos utilizados no estudo. O extrato promoveu um aumento na concentração de noradrenalina e serotonina em corpo estriado de camundongos após 1 dia, e aumento de dopamina, noradrenalina e serotonina após 15 dias. Na avaliação do estresse oxidativo, não se observou alterações nos níveis de malonildialdeído (MDA), na concentração da enzima catalase, e da glutathiona reduzida, e foi possível verificar uma redução na concentração de nitrito em ambas as doses utilizadas, em hipocampo de camundongos nos três tempos de tratamento. Não causou alterações histopatológicas hepáticas e renais em camundongos, após administração aguda nas doses de 550 e 2000 mg/kg. Nas concentrações de 50 a 200µg/mL não desenvolveu citotoxicidade e no teste de genotoxicidade não foi capaz de alterar o DNA celular de linfócitos humanos. Pode-se concluir que *Hoodia gordonii* mostrou resultados satisfatórios em roedores. Entretanto, é necessária a realização de outros estudos para garantir a segurança no uso do extrato e futuramente possa trazer benefícios à população.

Palavras - chave: Anorexia. Transtornos de Adaptação. Ansiedade. Monoaminas Biogênicas.

ABSTRACT

Hoodia gordonii has become consumed centuries, in order to promote a reduction in appetite, due to reduced food and water intake. Even today it is consumed in many countries. The present study investigated possible behavioral and metabolic alterations in rodents treated with *Hoodia gordonii* in different treatment periods. To evaluate body weight, the rats were weighted daily during the period of treatment and measured water and food intake. To investigate the behavioral (anxiety and depression) and neurochemical changes, the mice were tested for 1, 8 and 15 days of treatment with *Hoodia gordonii* (25 and 50mg/kg, oral), the experimental models being performed in the Elevated Plus Maze (EPM), Open Field (OF) test and other group mice submitted the Forced Swimming (FN) test. In order, to investigate the involvement with the monoaminergic system, the mice were pretreated with specific dopamine D₁ and D₂; α_1 and α_2 of noradrenaline, serotonin 5HT_{1A}, 5HT_{2A/2C}, 5HT_{3A} receptor antagonists in the forced swimming test. In addition, other groups of animals were pretreated with *H. gordonii* for 1, 8 and 15 days and after one hour, the striatum were removed for HPLC analysis of monoamines and hippocampus for the experiments of oxidative stress, such as enzymatic activity quantification of low levels of glutathione, catalase enzyme, nitrite/nitrate and malondialdehyde levels. The cytotoxicity (MTT) and genotoxicity (DNA) test was conducted in human lymphocytes. The results showed that, the extract reduced the body weight of the animals, as well as, food and water intake. In the behavioral testing, *Hoodia gordonii* presented anxiogenic effect in the EPM, reduced locomotor activity on day 1, 8 and 15 of treatment and antidepressant-like effect after the first dose administration, with reduced immobility time. It was interacted with noradrenergic, dopaminergic and serotonergic receptors used in this study. The extract promoted an increase in levels of norepinephrine and serotonin in the striatum of mice after 1 day, and increased monoamines dopamine, noradrenaline and serotonin after 15 days. The oxidative stress was not able to alter the levels of malondialdehyde (MDA), catalase, reduced glutathione in the hippocampus of mice, reduced the concentration of nitrite in both doses used in the three treatment times. The cellular DNA of human lymphocytes was not changed. *H. gordonii* did not cause liver and kidney after administration of doses 550 and 2000 mg/kg histopathology changes. Concentrations of 50 at 200 μ g/mL did not develop cytotoxicity and genotoxicity test, was not able to change the cellular DNA of human lymphocytes. It can be concluded that, *Hoodia gordonii* showed great results in rodents. However, other studies it's necessary to ensure the safe use of the extract, and it can be approved or not in our country.

Keywords: Anorexia. Adjustment disorders. Anxiety. Biogenic Monoamines.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Imagens de <i>Hoodia gordonii</i>	26
Figura 2- Estrutura molecular do p57	27
Figura 3 - Classe de danos das células cometas	39
Figura 4- Aparelho de HPLC.....	57
Figura 5 - Efeito da <i>Hoodia gordonii</i> administrado por via oral na variação do peso em ratos	68
Figura 6 - Efeito da administração de <i>Hoodia gordonii</i> 25 e 50 mg/kg sobre o consumo de comida e de água dos animais	70
Figura 7 - Efeito de <i>Hoodia gordonii</i> 25 e 50 mg/kg e diazepam 2mg/kg administrado via oral, por 1 dia, sobre o teste do labirinto em cruz elevado	72
Figura 8- Efeito de <i>Hoodia gordonii</i> 25 e 50 mg/kg e diazepam 2mg/kg administrado via oral, por 8 dias, sobre o teste do labirinto em cruz elevado.....	74
Figura 9 - Efeito de <i>Hoodia gordonii</i> 25 e 50 mg/kg e diazepam administrado via oral, por 15 dias, sobre o teste do labirinto em cruz elevado	76
Figura 10 - Efeito da <i>Hoodia gordonii</i> e diazepam por 1 dia, sobre a atividade locomotora espontânea no teste do campo aberto	77
Figura 10A e 10B - Efeito da <i>Hoodia gordonii</i> e diazepam por 1 dia, sobre o número de <i>grooming</i> e <i>rearing</i> no teste do campo aberto.....	78
Figura 11 - Efeito da <i>Hoodia gordonii</i> e diazepam por 8 dias, sobre a atividade locomotora espontânea no teste do campo aberto para camundongos	79
Figura 11A e 11B- Efeito da <i>Hoodia gordonii</i> e diazepam por 8 dias sobre o número de <i>grooming</i> e <i>rearing</i> no teste do campo aberto para camundongos	79
Figura 12 - Efeito da <i>Hoodia gordonii</i> e diazepam por 15 dias, sobre a atividade locomotora espontânea no teste do campo aberto para camundongos	80

Figura 12A e 12B- Efeito da <i>Hoodia gordonii</i> e diazepam por 15 dias, sobre o número de <i>grooming</i> e <i>rearing</i> no teste do campo aberto para camundongos	81
Figura 13- Efeito de <i>Hoodia gordonii</i> administrado por via oral, por 1 dia sobre o tempo de imobilidade no teste do nado forçado em camundongos.....	82
Figura 14- Efeito de <i>Hoodia gordonii</i> administrado por via oral, por 8 dias sobre o tempo de imobilidade no teste do nado forçado em camundongos.....	82
Figura 15- Efeito de <i>Hoodia gordonii</i> administrado por via oral, por 15 dias sobre o tempo de imobilidade no teste do nado forçado em camundongos.....	83
Figura 16 - Efeito de <i>Hoodia gordonii</i> (50 mg/kg) e bupropiona (30 mg/kg), via oral, sozinha ou associada com SCH23390 (0,5mg/kg), sobre o tempo de imobilidade (s) no teste do nado forçado em camundongos.....	84
Figura 17 - Efeito da <i>Hoodia gordonii</i> (50 mg/kg) e bupropiona (30 mg/kg), via oral, sozinhos ou associados com sulpirida (50 mg/kg), sobre o tempo de imobilidade (s) no teste do nado forçado em camundongos.....	85
Figura 18 - Efeito de <i>Hoodia gordonii</i> (50 mg/kg), via oral, sozinha ou associada com prazosina (1mg/kg), e ioimbina (1 mg/kg), sobre o tempo de imobilidade no teste do nado forçado em camundongos.....	86
Figura 19 - Efeito de <i>Hoodia gordonii</i> (50mg/kg) e fluoxetina (35mg/kg) via oral, sozinhos ou associados com PCPA (100mg/kg), sobre o tempo de imobilidade no teste do nado forçado.....	87
Figura 20 - Efeito de <i>Hoodia gordonii</i> (50mg/kg) e fluoxetina (35mg/kg) via oral, sozinhos ou associados com NAN-190 (0,5mg/kg), sobre o tempo de imobilidade no teste do nado forçado.....	88
Figura 21 - Efeito de <i>Hoodia gordonii</i> (50mg/kg) e fluoxetina (35mg/kg) via oral, sozinhos ou associados com ritanserina (1mg/kg), sobre o tempo de imobilidade no teste do nado forçado.....	89
Figura 22 - Efeito de <i>Hoodia gordonii</i> (50mg/kg) e fluoxetina (35mg/kg) via oral, sozinhos ou associados com ondansetrom (1mg/kg), sobre o tempo de imobilidade no teste do nado forçado.....	90

Figura 23 - Determinação da concentração de noradrenalina em corpo estriado de camundongos após tratamento de 1 dia com *Hoodia gordonii* (25 e 50mg/kg) via oral.....91

Figura 24- Determinação da concentração de serotonina e seu metabólito o ácido 5-hidroxiindolacético em corpo estriado de camundongos, após tratamento de 1 dia com *Hoodia gordonii* (25 e 50mg/kg) via oral.....92

Figura 25- Determinação da concentração de dopamina em corpo estriado de camundongos, após tratamento de 1 dia com *Hoodia gordonii* (25 e 50mg/kg) via oral.....93

Figura 26 - Determinação da concentração de ácido dihidroxifenilacético (DOPAC) e ácido 4-hidroxi-3-metoxi-fenilacético (HVA), metabólitos da dopamina, em corpo estriado de camundongos após tratamento de 1 dia com *Hoodia gordonii* (25 e 50mg/kg) via oral.....94

Figura 27 - Determinação da concentração de noradrenalina (NE) em corpo estriado de camundongos após tratamento de 8 dias com *Hoodia gordonii* (25 e 50mg/kg) via oral.....95

Figura 28- Determinação da concentração de serotonina (5HT-A) e seu metabólito o ácido 5-hidroxiindolacético (5HIAA-B), em corpo estriado de camundongos, após tratamento de 8 dias com *Hoodia gordonii* (25 e 50mg/kg), via oral.....96

Figura 29- Determinação da concentração de dopamina (DA) em corpo estriado de camundongos após tratamento de 8 dias com *Hoodia gordonii* (25 e 50mg/kg) via oral.....97

Figura 30- Determinação da concentração de ácido dihidroxifenilacético (DOPAC) e ácido 4-hidroxi-3-metoxi-fenilacético (HVA), metabólitos da dopamina em corpo estriado de camundongos após tratamento de 8 dias com *Hoodia gordonii* (25 e 50mg/kg) via oral.....98

Figura 31- Determinação da concentração de noradrenalina (NE) em corpo estriado de camundongos após tratamento de 15 dias com *Hoodia gordonii* (25 e 50mg/kg) via oral.....99

Figura 32- Determinação da concentração de serotonina (5HT) e seu metabólito ácido 5-hidroxiindolacético (5HIAA), em corpo estriado de camundongos, após tratamento de 15 dias com *Hoodia gordonii* (25 e 50mg/kg), via oral.....100

Figura 33- Determinação da concentração de dopamina (DA) em corpo estriado de camundongos após tratamento de 15 dias com *Hoodia gordonii* (25 e 50mg/kg) via oral....101

Figura 34 - Determinação da concentração de ácido dihidroxifenilacético e ácido 4-hidroxi-3-metoxi-fenilacético, metabólitos da dopamina em corpo estriado de camundongos após tratamento de 15 dias com <i>Hoodia gordonii</i> (25 e 50mg/kg) via oral.....	102
Figura 35 - Níveis de nitrito em hipocampo de camundongos após administração de <i>Hoodia gordonii</i> via oral por 1, 8 e 15 dias.....	104
Figura 36 - Efeito sobre os níveis de glutathiona reduzida (GSH) em hipocampo de camundongos após administração de <i>Hoodia gordonii</i> via oral por 1, 8 e 15 dias.....	105
Figura 37 - Efeito sobre a atividade da enzima catalase em hipocampo de camundongos após administração de <i>Hoodia gordonii</i> , via oral por 1, 8 e 15 dias.....	106
Figura 38 - Efeito sobre os níveis de malonildialdeído em hipocampo de camundongos após administração de <i>Hoodia gordonii</i> via oral por 1, 8 e 15 dias.....	107
Figura 39 - Efeito de <i>Hoodia gordonii</i> em hipocampo de camundongos após tratamento nas doses de 500, 1000 e 2000mg/kg.....	111
Figura 40 – Avaliação dos efeitos de <i>Hoodia gordonii</i> em linfócitos humanos periféricos expostos ao composto por 24 e 72h através do ensaio do MTT.....	112
Figura 41 - Índice de dano ao DNA de linfócitos humanos expostos 24h a <i>Hoodia gordonii</i>	112

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Apresentação das drogas e reagentes.....	47
Quadro 2 - Apresentação dos principais equipamentos utilizados.....	48
Quadro 3 - Esquema de teste Labirinto em cruz elevado.....	50
Quadro 4 - Esquema do teste Campo aberto.....	51
Quadro 5 - Esquema do teste Nado forçado.....	52
Quadro 6 – Esquema de tratamento com antagonistas monoaminérgicos.....	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 01- Peso dos animais tratados com <i>Hoodia gordonii</i> por 15 dias.....	69
Tabela 02 - Taxa de metabolização de monoaminas dopamina e serotonina em corpo estriado de camundongos após tratamento de <i>Hoodia gordonii</i> por 1 dia.....	103
Tabela 03 - Taxa de metabolização de monoaminas dopamina e serotonina em corpo estriado de camundongos após tratamento de <i>Hoodia gordonii</i> por 8 dias.....	103
Tabela 04 - Taxa de metabolização de monoaminas dopamina e serotonina em corpo estriado de camundongos após tratamento de <i>Hoodia gordonii</i> por 15 dias.....	103
Tabela 05 - Análise bioquímica dos níveis séricos de glicose, TGO, TGP, colesterol total e triglicérides após administração de <i>Hoodia gordonii</i> por via oral durante 15 dias em ratos.	109
Tabela 06 - Escores das alterações histopatológicas no hipocampo de camundongos tratados com <i>H. gordonii</i>	110

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

5HT - serotonina

5-HIAA - ácido 5-hidroxiindolacético

R α - receptor alfa-adrenérgico

α -MSH - alfa-melanócito

AGL - ácidos graxos livres

ALE - atividade locomotora espontânea

ALT/TGP - alanina aminotransferase/ transaminase glutâmico pirúvica

ANOVA - Análise de variância

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AST/TGO - aspartato aminotransferase/transaminase glutâmico oxalacética

ATP - adenosina trifosfato

R β - receptor beta adrenérgico

CAT - catalase

CART - transcrição reguladora de cocaína e anfetamina

CCK - colecistocinina

CSIR - *South African Council for Scientific and Industrial Research*

RD - receptor dopaminérgico

DA - dopamina

DNA - ácido desoxirribonucléico

DOPAC - ácido dihidroxifenilacético

DZP - diazepam

EPM - Erro padrão da média

EROs - Espécies reativas do oxigênio

et al - e colaboradores

g - gramas

GABA - ácido gama aminobutírico

GSSG - glutatona oxidada

GSH-Px - glutatona-peroxidase

GSHRd - glutatona redutase

GSH - glutatona reduzida

GOD - glicose oxidase

HDL-colesterol - lipoproteínas de alta densidade

H/E - hematoxilina e eosina

H₂O[•] - radical hidropoxila

H₂O₂ - peróxido de hidrogênio

HPLC - *High Performance Liquid Chromatographic*

HVA - ácido 4-hidroxi-3-metoxi-fenilacético

IMC - índice de massa corporal

i.p. - via intraperitoneal

LCE - Labirinto em Cruz Elevado

LDH - lactato desidrogenase

LDL-colesterol - lipoproteínas de baixa densidade

mA - miliamperes

MAOA - monoamina oxidase A

MDH - malato desidrogenase

mL - mililitros

mM - milimol

μM - micromol

MDA - malonildialdeído

MTT -3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina

NADPH - fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina reduzido

NE - noradrenalina

NEBA - Número de entradas nos braços abertos

nm - nanômetro

nM- nanomol

PEBA - Percentagem de entradas nos braços abertos

POMC - pró-ópio-melanocortina

PTBA - Percentagem de tempo de permanência nos braços abertos

PVN - Núcleo paraventricular

O₂^{•-} - radical superóxido

OECD - *Organisation for Economic for Co-operation and Development*

OH[•] - radical hidroxila

RNA - ácido ribonucléico

rpm - rotações por minuto

SCGE - *Single - cell gel electrophoresis*

SNC - Sistema nervoso central

SOD - superóxido dismutase

TBARS - substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

TPBA - Tempo de permanência nos braços abertos

V- volts

VLDL-colesterol - lipoproteínas de muito baixa densidade

v.o. - via oral

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	23
1.1 Sobrepeso e obesidade: uso de anorexígenos.....	24
1.2 <i>Hoodia gordonii</i>	25
1.3 Função das monoaminas na regulação do peso.....	29
1.4 Ansiedade e depressão na obesidade.....	35
1.5. Estresse oxidativo relacionado à obesidade e ao uso de anorexígenos.....	36
1.6. Ensaio cometa.....	39
2. RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA	41
3. OBJETIVOS	43
3.1 Objetivo Geral.....	44
3.2 Objetivos Específicos.....	44
4. MATERIAL E MÉTODOS	45
4.1 Animais	46
4.2 Drogas	46
4.3 Drogas e reagentes.....	47
4.4 Principais equipamentos utilizados.....	48
4.5 Tratamento dos animais e Procedimento experimental	49
4.6 Testes comportamentais.....	50
4.6.1 Teste do Labirinto em Cruz elevado.....	50
4.6.2 Teste do Campo aberto.....	51
4.6.3 Teste do Nado forçado	51
4.7 Envolvimento dos sistemas monoaminérgicos.....	52

4.8 Protocolo dos experimentos neuroquímicos.....	54
4.8.1 Dissecção das áreas cerebrais.....	54
4.8.2 Determinação da concentração de monoaminas e seus metabólitos com HPLC.....	55
4.8.3 Estresse oxidativo.....	58
4.8.3.1 Avaliação dos níveis de Peroxidação Lipídica (dosagem de malonildialdeído).....	58
4.8.3.2 Avaliação da atividade da enzima catalase.....	58
4.8.3.3 Determinação da Concentração da Glutathiona Reduzida (GSH).....	59
4.8.3.4 Dosagem de Proteína (Método de Lowry)	59
4.8.3.5 Determinação dos níveis de nitrito/nitrato.....	60
4.9 Análises bioquímicas.....	61
4.9.1 Glicose.....	61
4.9.2 Triglicerídeos.....	61
4.9.3 Colesterol total.....	62
4.9.4 Aspartato Aminotransferase (AST).....	62
4.9.5 Alanina Aminotransferase (ALT).....	63
4.10 Estudo de toxicidade.....	63
4.11 Genotoxicidade e citotoxicidade <i>in vitro</i>	64
4.11.1 Teste MTT.....	65
4.11.2 Teste do cometa.....	65
4.12 Análise estatística.....	66
5. RESULTADOS	67
5.1 Avaliação do peso corporal do animal.....	68
5.2 Avaliação da ingestão de água e comida.....	69
5.3 Estudos comportamentais.....	70
5.3.1 Teste do Labirinto em cruz elevado (LCE) para camundongos.....	70
5.3.2 Teste do Campo aberto.....	76

5.3.3	Teste do Nado forçado.....	81
5.4	Investigação do mecanismo antidepressivo-símile de <i>Hoodia gordonii</i> : Envolvimento dos sistemas monoaminérgicos.....	83
5.4.1	Sistema Dopaminérgico.....	83
5.4.2	Sistema Noradrenérgico.....	85
5.4.3	Sistema Serotonérgico.....	86
5.5	Avaliação dos efeitos de <i>Hoodia gordonii</i> sobre a concentração de noradrenalina, serotonina, dopamina e seus metabólitos por HPLC.....	90
5.6	Avaliação dos efeitos de <i>Hoodia gordonii</i> sobre o estresse oxidativo em hipocampo de camundongos.....	103
5.6.1	Determinação dos níveis de Nitrito.....	103
5.6.2	Determinação dos níveis de Glutathiona Reduzida (GSH).....	104
5.6.3	Determinação da atividade da enzima Catalase.....	105
5.6.4	Determinação dos níveis de Malonildialdeído.....	106
5.7	Avaliação dos efeitos de <i>Hoodia gordonii</i> sobre parâmetros bioquímicos.....	107
5.8	Análise histopatológica de tecidos expostos a <i>Hoodia gordonii</i> em altas concentrações.....	108
5.9	Avaliação do potencial citotóxico de <i>Hoodia gordonii</i>	110
6.	DISCUSSÃO	112
7.	CONCLUSÃO	140
	REFERÊNCIAS	143
	ANEXOS	168

1. INTRODUÇÃO

1.1. Sobrepeso e obesidade: o uso de anorexígenos

Atualmente, tem-se observado uma elevação dos índices de excesso de peso e da obesidade no mundo todo, afetando aproximadamente 1,5 bilhões de indivíduos com sobrepeso e 500 milhões de obesos no mundo todo (WHO, 2011). A obesidade é caracterizada como uma doença crônica, multifatorial, e atualmente representa um dos maiores desafios de saúde pública em todo o mundo. O panorama brasileiro tem revelado que as prevalências de sobrepeso e obesidade cresceram de maneira alarmante nos últimos anos, representando 51% da população adulta, aumentando com a idade até os 54 anos, em ambos os sexos (BRASIL, 2013). Associado a estas condições clínicas, é válido ressaltar o surgimento de comorbidades como *Diabetes mellitus*, hiperlipidemia, hipertensão arterial, doenças degenerativas e algumas formas de câncer (BRAY, 2004).

Em decorrência da multifatorialidade (fatores genéticos, ambientais, sociais e culturais) referente ao sobrepeso e obesidade, muitas são as formas de tratamento para tais condições clínicas, incluindo a intervenção no estilo de vida por meio de programa alimentar e de atividade física, sempre com o objetivo de melhorar a qualidade de vida do indivíduo obeso e diminuir os riscos de doenças e de morte (BRAY & GREENWAY, 1999). Somente na impossibilidade de adesão a essa abordagem clínica, particularmente nos casos mais graves, a prescrição de medicamentos anorexígenos (fármacos que provocam supressão do apetite, diminuindo ou abolindo o mesmo) deve ser considerada (WHO, 2006).

Os agentes farmacológicos atualmente disponíveis para o tratamento da obesidade agem por diferentes mecanismos. Existem aqueles que alteram o balanço energético através da diminuição da ingestão de alimentos pela inibição do apetite que são os fármacos anorexígenos. Os termogênicos são aqueles que agem aumentando a energia despendida por acelerar o metabolismo basal, enquanto outros fármacos agem ainda reduzindo a absorção de nutrientes a partir do trato gastrointestinal (KORDIK & REITZ, 1999). Os anorexígenos de ação central são fármacos catecolaminérgicos derivados das anfetaminas, no qual estão incluídos o femproporex, anfepramona e mazindol. Estes medicamentos agem estimulando a liberação e/ou bloqueando a recaptação de dopamina, com conseqüente estimulação do centro de saciedade nas áreas hipotalâmica e límbica do cérebro (MANCINI & HALPERN, 2002).

Embora não aprovados formalmente como drogas antiobesidade, diversos outros medicamentos são também utilizados para este fim, tais como a fluoxetina e sertralina (antidepressivos), o topiramato (anticonvulsivante), a efedrina (amina simpatomimética proibida para este fim) e a cafeína (metil-xantina) (WILDING *et al.*, 2004; QUEIROZ, 2008).

Novas drogas anorexígenas destinadas ao tratamento do sobrepeso e obesidade estão em fase avançada de estudo, com resultados promissores, como a lorcaserina, um agonista seletivo do receptor 5HT_{2c} (SMITH *et al.*, 2009), antagonistas do neuropeptídeo Y (MACNEIL, 2007), agonistas beta-3-adrenérgicos (OMACHI *et al.*, 2007), dentre outros. É válido destacar que várias substâncias usadas em fórmulas emagrecedoras apresentam substâncias oriundas de plantas, e na maioria dos casos são contra-indicadas e/ou proibidas por falta de estudos que confirmem eficácia e devido aos inúmeros efeitos colaterais induzidos. Como exemplo tem-se a cáscara sagrada (*Rhamnus purshiana* D.C.), o chá verde (*Camellia sinensis* L), o guaraná (*Paullinia cupana*), o salgueiro-branco (*Salix Alba*) e, dentre várias outras, a espécie *Hoodia gordonii* (QUEIROZ, 2008).

1.2. *Hoodia gordonii*

As espécies do gênero *Hoodia* são vegetais com talos suculentos e protegidos por espinhos; possuem flores exuberantes e podem alcançar um metro de altura. Por sua notável similaridade com as espécies da família Cactaceae, estes vegetais têm sido erroneamente referidos como “cactos” (BRUYNS, 2005). *Hoodia gordonii* é uma das treze espécies do gênero *Hoodia*, pertencente à subfamília Asclepiadoideae da Família Apocynaceae (ENDRESS & BRUYNS, 2000).

O consumo da *Hoodia gordonii* é milenar entre os nativos de tribos indígenas sul-africanas, sobretudo pelos *Bushmen*, da tribo San, que habitavam (e alguns ainda habitam atualmente) as proximidades do deserto de Kalahari na África Austral. Os *Bushmen* se alimentavam da planta para reprimir o apetite durante longas expedições de caça no deserto africano do Kalahari. Em tais jornadas, estes povos não se alimentavam durante dois ou três dias de caças, mas mascavam o suculento caule de *Hoodia gordonii* e tinham a sua fome e sede suprimidas (MOHLAPO *et al.*, 2009).



FIGURA 1. Imagens de *Hoodia gordonii*. (A) Arbusto *Hoodia gordonii* no deserto de Kalahari, semi-árido do sul da África, com alguma floração. Fonte: <http://www.tradeavail.com/> (B) Floração exuberante de *Hoodia gordonii*. Fonte: <http://www.weight-loss-secret.com/> (C) Detalhe das flores exuberantes roxas pálidas. Fonte: <http://www.fastweightlossreviews.net/blog/2009/04/fast-weight-loss/>

Em 1937, um antropólogo holandês que estudava os nativos da tribo San observou e notificou o uso da *H. gordonii* como supressor de fome e sede. Em uma reativação deste projeto, em 1986, as espécies do gênero *Hoodia* foram novamente investigadas, o que levou a estudos futuros conduzidos pelos pesquisadores do South African Council for Scientific and Industrial Research (CSIR) e à identificação de um composto ativo desta planta. A substância foi batizada como P57 e a sua indicação como supressor do apetite foi patenteada pelo pesquisador Van Heerden e colaboradores, em 1998 (VAN HEERDEN, 2008). Antes disso, ainda em 1997, a empresa de biotecnologia inglesa *Phytopharm* foi licenciada para uma colaboração com o CSIR nas pesquisas referentes às propriedades anorexígenas da *H. gordonii*. O acordo comercial concedeu à *Phytopharm* o direito de desenvolver e comercializar o P57 no mundo todo, enquanto o CSIR reteve os direitos de comercialização (LEE & BALICK, 2007).

Em 1998, a empresa farmacêutica *Pfizer* adquiriu os direitos da *Phytopharm* para também desenvolver e comercializar o P57 como uma droga potencialmente emagrecedora. Cinco anos após, em 2003, a empresa *Pfizer* devolveu os direitos à *Phytopharm* e descontinuou as pesquisas com o P57, cujas razões não foram completamente esclarecidas. Nesse ínterim, ao ser informado da possível exploração de seu conhecimento, a tribo San ameaçou processar o CSIR por biopirataria, alegando uma falha no cumprimento das regras da Convenção sobre Biodiversidade, que exigem o consentimento autorizado prévio de todas as partes interessadas, inclusive descobridores e usuários originais. Em março de 2002, a

Phytopharm chegou a um acordo com os nativos San restantes, através do qual eles, reconhecidos como guardiões do conhecimento tradicional associado à planta *H. gordonii*, receberiam uma parte dos *royalties* futuros (LEE & BALICK, 2007).

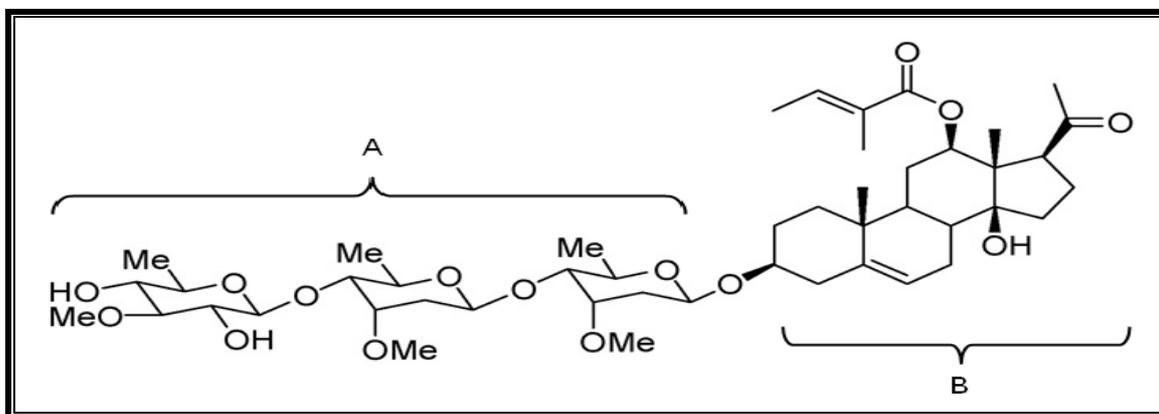


FIGURA 2. Estrutura molecular do P57 ou P57AS3 (3 β -[β -D-tevetopiranosil-(1 \rightarrow 4)- β -D-cimaropiranosil-(1 \rightarrow 4)- β -D-cimaropiranosiloxy] -12- β -tigloiloxi-14 β -hidroxi-pregn-5-em-20-one), um glicosídeo esteroidal com propriedades anorexígenas presente na *H. gordonii*. (A) Anéis glicosídicos; (B) Núcleo esteroidal. Fonte: adaptado de Van Heerden et al., 2007 e Van Heerden, 2008.

Além do seu uso milenar como supressor de apetite e sede, diversos outros usos tradicionais dessa espécie têm sido relatados pela população africana, incluindo o tratamento de cólicas abdominais, hemorróidas, tuberculose, diabetes e também como afrodisíaco e estimulante do humor (FOLDEN, 2008). No entanto, nos últimos anos, a *Hoodia gordonii* tem suscitado enorme interesse de consumidores, cientistas e indústrias (farmacêuticas e alimentícias), devido à sua provável propriedade anorexígena, sugerida com base em achados etnofarmacológicos e demonstrada em recentes estudos (VAN HEERDEN *et al.*, 2007; MOHLAPO *et al.*, 2009).

Extratos de *H. gordonii* demonstraram uma notável capacidade para aumentar a saciedade em vários estudos animais, tornando-os ingredientes atrativos na confecção de produtos naturais destinados ao controle do peso corporal. Embora ainda preliminares, estudos demonstram que os principais constituintes ativos presentes nos extratos de *H. gordonii* consistem de glicosídeos esteroidais (DALL'ACQUA & INNOCENTI 2007; VAN HEERDEN, 2008), no qual até o momento, 24 deles foram isolados e quantificados por diferentes autores (DALL'ACQUA & INNOCENTI, 2007; VAN HEERDEN *et al.*, 2007;

ABRAHAMSE *et al.*, 2007). Nesses estudos, observa-se que ainda não há uma nomenclatura em comum para os glicosídeos encontrados no extrato de *H. gordonii*.

Embora, atualmente, extratos de *H. gordonii* e seus constituintes isolados sejam frequentemente apresentados em produtos da indústria farmacêutica e alimentícia (AVULA *et al.*, 2006), estudos científicos referentes às suas propriedades biológicas e farmacológicas ainda são escassos na literatura. Experimentos desta natureza começaram a surgir após a patente do primeiro produto dotado de propriedades anorexígenas contendo o composto P57 (VAN HEERDEN *et al.*, 1998). Estudos subsequentes confirmaram esta ação também em extratos provenientes de outras espécies do gênero *Hoodia* (TULP *et al.*, 2001). Patentes relativas à atividade anti-diabética e ao tratamento de dano gástrico através do uso de extratos de *H. gordonii* foram também desenvolvidas (HORAK *et al.*, 2001; RUBIN, CAWTHORNE & BINDRA, 2002).

Recentemente, experimentos com ratos utilizando o extrato bruto e o glicosídeo P57 durante um período de oito dias mostraram uma redução significativa do consumo e massa corporal dos animais, quando comparados aos grupos controle tratados apenas com veículo (VAN HEERDEN *et al.*, 2007). Para investigar se o composto ativo estaria atuando em nível de sistema nervoso central (SNC), MACLEAN & LUO (2004) injetaram o P57 diretamente no terceiro ventrículo cerebral de ratos. Eles observaram uma redução de 50-60% na ingestão de alimentos durante um período de 24 h, a qual foi acompanhada por um aumento da concentração de adenosina trifosfato (ATP) no hipotálamo dos animais. Ainda nesse estudo, foi demonstrado que o P57 reverteu a redução de ATP normalmente observada após uma dieta hipocalórica. Os autores apontam o ATP como fonte de sensação energética, o que causaria as respostas neurais, endócrinas e de saciedade apropriadas, e concluíram que, pelo menos em parte, este seria um provável mecanismo de ação anorexígena da *H. gordonii*.

Até o presente momento, poucos são os estudos cientificamente reconhecidos realizados em seres humanos para investigar os efeitos do uso de *H. gordonii* e seus derivados na perda de peso (BLOM *et al.*, 2011). Um relato da empresa *Phytopharm* divulgou os resultados de um estudo randomizado, controlado por placebo, realizado com 18 indivíduos sob condições de dieta controlada com o P57, por um período total de 15 dias. Os resultados preliminares desta pesquisa indicaram uma redução significativa na média diária de ingestão de calorias no grupo tratado com o P57 (LEE & BALICK, 2007). Outro estudo com mulheres

em sobrepeso que usaram *H. gordonii* por 15 dias não apresentaram alteração do peso em comparação ao grupo controle (BLOM *et al.*, 2011).

Apesar dos diversos produtos contendo *H. gordonii* oferecidos pela indústria alimentícia e farmacêutica em vários países do mundo, sobretudo nos Estados Unidos, onde ela é vendida livremente, estudos validados pela comunidade científica ainda não constataram a sua eficácia e segurança, de modo que tais produtos não possuem registro como medicamento em nenhuma parte do mundo. Devido a este fato, no Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) determinou, em todo o território nacional, a proibição de propagandas veiculadas em todos os meios de comunicação (RDC/ANVISA nº 423, 2007), bem como proibiu a manipulação de todos os produtos à base de *Hoodia Gordonii* (RDC/ANVISA nº 424, 2007).

1.3 Função das monoaminas na regulação do peso

A descoberta do envolvimento do sistema monoaminérgico (serotonina, dopamina e noradrenalina) em diversas funções fisiológicas, como na regulação da ingesta alimentar, favoreceu ao desenvolvimento de medicamentos utilizados no tratamento da obesidade que atuam neste sistema (CUADRA *et al.*, 2001; HALPERN & MANCINI, 2003). Dentre as monoaminas, a serotonina recebe destaque em inibir o apetite, pois a inoculação de agentes serotoninérgicos no hipotálamo resulta na diminuição da ingesta alimentar, assim como a utilização de antagonistas conduz a efeito oposto (LEIBOWITZ *et al.*, 1988; LAVIANO & MEGUID, 2003).

A 5-HT apresenta controle sobre a fome e a saciedade através de diversos receptores, com diferentes funções. Existem sete famílias diferentes de receptores de 5-HT, e em algumas dessas famílias há vários subtipos, principalmente em receptores 5-HT₁ e 5-HT₂, que são responsáveis pela redução da ingestão alimentar, o que é comprovado pela administração de agonistas serotoninérgicos como quipazina, meta-clorofenilpiperazina e d-norfenfluramina no núcleo paraventricular (SCHELLEKENS *et al.*, 2012).

Evidências farmacológicas têm sugerido que receptores 5-HT₁, diferentemente dos 5-HT₂ ou 5-HT₃, são o subtipo de receptor responsável pelos efeitos da serotonina no

comportamento alimentar, na região do hipotálamo medial (FERREIRA & GOMES, 2009). O que foi demonstrado pela administração de injeções periféricas, ou no hipotálamo de agentes serotoninérgicos, ou antagonistas β -adrenérgicos, que apresentam uma relativa afinidade por receptores 5-HT₁, significativamente reduziram a atividade supressora do apetite (HAMMER *et al.*, 1990). Os receptores 5-HT_{1B} modulam a liberação endógena de ambos os agonistas e antagonistas dos receptores da melanocortina, que participam do controle da homeostase do peso corporal (ABIZAID *et al.*, 2006).

O receptor 5-HT_{2C} parece ser o mais importante na relação entre ingestão alimentar e balanço energético. Camundongos desprovidos desse gene tornam-se obesos e epiléticos, enquanto o uso de agonistas com atividade no receptor 5-HT_{2C} produz uma diminuição na ingestão alimentar (SCHELLEKENS *et al.*, 2012; HEISLER *et al.*, 2007). Agindo por meio de seu receptor 5-HT_{2C}, a serotonina ativa diretamente a clivagem da pró-ópio-melanocortina (POMC). Pelo receptor 5-HT_{1B}, a serotonina hiperpolariza e inibe, no núcleo arqueado, o neuropeptídeo Y e o peptídeo AgRP, deprimindo a transmissão inibitória gabaérgica do hormônio estimulador α -melanócito (α -MSH) e transcrição reguladora de cocaína e anfetamina (CART). Estes mecanismos associados produzem saciedade e estímulo à termogênese. Por isso estes receptores têm sido investigados no tratamento da obesidade (COLLINS *et al.*, 2002).

Recentemente, o papel do receptor 5-HT_{2C} na homeostase da glicose também foi relatado em roedores. Estudos farmacológicos e genéticos mostram efeito direto do receptor 5-HT_{2C} sobre a homeostase da glicose. Demonstrou-se melhora na tolerância à glicose em ratos tratados com inibidores da recaptação da serotonina. A interação entre serotonina e leptina na homeostase da glicose faz do sistema serotoninérgico um possível alvo para o tratamento de diabetes e obesidade (SCHELLEKENS *et al.*, 2012). E quando ocorre polimorfismo neste receptor é observada uma desregulação no controle do peso (ROSMOND *et al.*, 2004).

No entanto, a serotonina desempenha também muitas outras funções fisiológicas e por esse motivo, agentes serotoninérgicos, como a sibutramina, fenfluramina, sertralina e fluoxetina possuem vários efeitos colaterais, o que limita o uso dessas substâncias como drogas antiobesidade. Dentre os efeitos colaterais, destacam-se a hipertensão pulmonar, a cefaléia, a constipação, a náusea e a hipertensão arterial (SCHEEN & LEFEBVRE, 1999), que estão associados à estimulação dos receptores serotoninérgicos. E doenças valvares devido à

estimulação de receptores β_2 , como no caso da fenfluramina e dexfenfluramina (GUY-GRAND *et al.*, 1989).

Um estudo com microdiálise identificou a relação de dopamina e serotonina na alimentação, no qual foi observada uma liberação sincronizada (um aumento) de dopamina e serotonina na região do hipotálamo, no período em que os animais estavam alimentados e durante o jejum, já no momento da ingesta alimentar havia uma redução da liberação destas monoaminas (FETISSOV *et al.*, 2000). O que vem mostrar a estreita relação destas monoaminas durante o momento de alimentação e jejum na região do hipotálamo.

O sistema dopaminérgico também desempenha um importante papel na motivação de comportamentos, inclusive do comportamento alimentar. O consumo de alimentos aumenta os níveis de dopamina no cérebro de animais e de humanos, fato este relacionado às sensações de prazer. Animais de laboratório modificados geneticamente para não produzir dopamina mostram uma estreita relação: perdem a motivação, deixam de comer e acabam morrendo de inanição. À medida que seu cérebro recebe doses periódicas do neurotransmissor, voltam a se alimentar normalmente (DILEONE, 2009). Camundongos *knockouts* para o transportador de dopamina (com conseqüente nível de dopamina extracelular elevado) mostraram maior disponibilidade para trabalhar por uma recompensa alimentar (CAGNIARD *et al.*, 2006), demonstrando a importância da dopamina na regulação alimentar.

As áreas cerebrais envolvidas com o comportamento alimentar relacionada a dopamina são principalmente a região nigroestriatal (alimentação) e região mesolímbica (aspectos da alimentação – motivação e recompensa) (SCHWARTZ *et al.*, 2000; PALMITER, 2007).

Estudo utilizando imagens de cérebro humano tem mostrado que as reduções nos receptores dopaminérgicos D_2 têm sido associadas com a obesidade, mas estas reduções não estão claras se são causas, ou conseqüências da obesidade (WANG *et al.*, 2001). Animais obesos com déficit de receptores D_2 apresentaram um comportamento alimentar compulsivo, voltado principalmente para o consumo de alimentos saborosos (JOHNSON & KENNY, 2010). Os receptores D_3 também parecem participar e interagir com vários dos principais mensageiros de sinalização (como a insulina, leptina e grelina) na modulação da recompensa e saciedade obtida através da ingestão de alimentos (THANOS *et al.*, 2008).

Tem sido proposto que a relação da obesidade com a genética pode ser mediada por uma atividade dopaminérgica anormal no hipotálamo (VOLKOW *et al.*, 2008). O polimorfismo de alguns receptores de dopamina D₂, do genótipo A1A1 e A1A2 (alelo A1) parece estar associado com a obesidade e as evidências indicam que os indivíduos portadores desse alelo têm a densidade dos receptores D₂ reduzida no cérebro em comparação com outros indivíduos (BARNARD *et al.*, 2009).

Sabe-se que os obesos apresentam uma menor disponibilidade dos receptores da dopamina, quando comparado com os grupos controle ou uma alteração na expressão destes receptores (FRANK *et al.*, 2005) e que há uma relação linear inversa entre o subtipo de receptores de dopamina D₂ disponível e do índice de massa corporal (IMC) (THANOS *et al.*, 2008).

Duas hipóteses têm sido propostas para explicar a redução na atividade dos receptores dopaminérgicos em pacientes obesos. A primeira hipótese é a de que hiperatividade crônica das vias dopaminérgicas em indivíduos obesos pode levar a *down regulation* de receptores, como acontece de forma semelhante no desenvolvimento de resistência à insulina em pacientes obesos. A segunda hipótese propõe que uma deficiência primária em receptores de DA, pode levar a uma baixa estimulação dos circuitos de recompensa, resultando em excessos como uma forma de compensação, conhecido como "síndrome de deficiência de recompensa" (GOLDFIELD; LORELLO & DOULCET, 2007).

Geiger *et al.* (2008) em sua pesquisa sobre a neurotransmissão dopaminérgica em ratos alimentados com uma dieta para produzir obesidade (dieta incluiu alimentos com alto teor de carboidratos e gordura) concluiu que o sistema dopaminérgico mesolímbico desempenha um papel crítico na hiperfagia, de preferência a dietas hipercalóricas e conseqüente obesidade gerada por este tipo de alimentação, uma vez que este grupo de animais mostrou uma diminuição da neurotransmissão dopaminérgica no *núcleo accumbens* e corpo estriado. O estudo também descobriu que os animais podem restaurar temporariamente os níveis de dopamina comendo alimentos com alta palatabilidade, no qual têm grandes quantidades de gorduras e carboidratos.

Outro trabalho de Geiger *et al.* (2009) mostrou que as deficiências no sistema de dopamina no mesencéfalo de ratos propensos à obesidade estão em locais diferentes no início de vida do indivíduo. Os autores concluem que um déficit na neurotransmissão dopaminérgica

mesolímbica é um componente essencial e uma predisposição fenótipo neuroquímico para a obesidade. E os excessos, como a liberação de dopamina a uma resposta comportamental e aumento compensatório central em conjunto, reforçam a importância da motivação e vias reguladas pela recompensa para além da regulação homeostática do apetite e alimentação no hipotálamo e, reforçando o argumento de que a obesidade poderia ser abordada como um vício e não só como um desequilíbrio metabólico.

Por fim, a noradrenalina também está envolvida com os mecanismos que controlam o comportamento alimentar (WELLMAN, 2000). A ativação do eixo hipotalâmico-hipofisário adrenal e ativação simpático-medular leva à liberação de adrenalina pela medula adrenal e noradrenalina das terminações nervosas na circulação. Respostas da catecolamina ao exercício representam uma das diferenças comuns relatadas entre indivíduos obesos e normais (TENTOLOURIS; LAITIS & KATSILAMBROS, 2006). Na verdade, parece que, homens e mulheres adultos obesos apresentaram significativamente maiores concentrações de adrenalina e noradrenalina em repouso e respostas mais baixas de adrenalina e noradrenalina a vários estímulos diferentes, tais como a ingestão de alimentos e exercício físico (SALVADORI *et al.*, 2003). A mobilização de lipídios durante o exercício é dependente principalmente do aumento da atividade simpático-adrenal que leva à liberação de adrenalina pela medula adrenal e liberação de noradrenalina das terminações nervosas para a circulação (CRAMPES *et al.*, 2003).

Estudos farmacológicos têm demonstrado que drogas que aumentam a noradrenalina endógena reduzem o consumo alimentar (MARGULES, 1970; GEHLERT *et al.*, 1998). Além disso, a adrenalina inicia a lipólise através da ativação de receptores β_3 do tecido adiposo, o que leva ao efeito final de hidrólise dos triacilgliceróis em ácidos graxos livres e glicerol. Desta forma, é crescente a pesquisa por novos fármacos agonistas beta-3 seletivos para o tratamento da obesidade (MARUYAMA *et al.*, 2009). Mutação no receptor β_3 está associado com dificuldade na perda de peso (SHIWAKU *et al.*, 2003). Em relação aos receptores α -adrenérgicos, existe uma relação que a redução na ingestão de alimentos produzidos pela sibutramina é em grande parte devido ao aumento da atividade noradrenérgica ao nível dos receptores α_1 (JACKSON *et al.*, 1997), este tipo de receptor também parece estar envolvido no aumento da atividade cardiovascular (WOOLARD *et al.*, 2004).

Assim, dados prévios que evidenciam alterações comportamentais e monoaminérgicas consequentes ao uso de vários agentes anorexígenos justificam a proposta da atual pesquisa de

investigar o comportamento das monoaminas cerebrais durante o tratamento de animais com *H. gordonii*.

1.4. Ansiedade e depressão na obesidade

Autores relatam que existe uma estreita relação do surgimento de sintomas depressivos ou de ansiedade durante a obesidade. As pessoas obesas são em muitos casos considerados alvos de preconceito e discriminação, o que contribui para o surgimento de distúrbios psicossociais (TEICHMANN *et al.*, 2006). A sintomatologia da ansiedade é pouco relatada na literatura em pacientes obesos. Estudo clínico recente tem verificado um índice maior desta patologia em homens negros do caribe e mulheres negras africanas que apresentavam sobrepeso e não foi observada nenhuma relação do surgimento de depressão nestes indivíduos (ASSARI, 2014). Pesquisa realizada no Brasil, com pacientes internados, encontrou uma associação de ansiedade com patologias crônicas, e a obesidade correspondeu a 71,43% dos casos (GULLICH *et al.*, 2013). Neste caso, o ato de comer é justificado como uma maneira de reduzir esta ansiedade, mostrando um ganho de peso corporal associado ao nível de ansiedade (CAPITÃO & TELO, 2004).

Em relação à depressão, as pesquisas retratam esta associação. Autores utilizaram três escalas de depressão em um estudo clínico e verificaram uma relação da presença de obesidade abdominal com o surgimento da depressão (AHLBERG *et al.*, 2002), o que foi verificado também por Hainer *et al.* (2006). E quando ocorre esta associação, os índices maiores ocorrem no sexo feminino. Entretanto, pesquisadores não esclarecem bem esta relação.

Esta sintomatologia pode estar associada também ao uso de medicamentos. Pesquisa mostra que sintomas de ansiedade e depressão consistem em frequentes manifestações iniciais da síndrome de abstinência ao uso continuado de substâncias psicoestimulantes, como a cocaína ou drogas anorexígenas derivadas da anfetamina (SOFUOGLU *et al.*, 2005). Estas manifestações clínicas são conseqüências de alterações neuroadaptativas (transitórias ou persistentes) em determinadas áreas cerebrais, causadas pelo uso repetido da droga, as quais podem predizer o comportamento de busca durante períodos de abstinência (TANG *et al.*, 2004).

Vale salientar que as monoaminas estão envolvidas na fisiopatologia da obesidade e da depressão, e a literatura afirma que fármacos usados no tratamento da depressão estão também sendo testados no tratamento da obesidade. GW320659, inibidor de recaptação de dopamina e noradrenalina, está sendo investigado como fármaco anti-obesidade, mostrando resultados satisfatórios (SPRAGGS *et al.*, 2005). A riboxetina, usada no tratamento da depressão e da dor crônica foi administrada em voluntários sadios e foi capaz de estimular a secreção de cortisol mais em homens que em mulheres (KRELL *et al.*, 2005; TSE & BOND, 2005) e foi identificado um caso de redução de peso em mulher que não apresentava sobrepeso (LU *et al.*, 2005).

Diante desta perspectiva, o presente estudo investigou a ação de *H. gordonii* (1, 8 e 15 dias de administração) em camundongos, no teste do nado forçado, bem como foram utilizados fármacos antagonistas de monoaminas para investigar possível interação.

1.5. Estresse oxidativo relacionado à obesidade e ao uso de anorexígenos

Como referido anteriormente, a obesidade é reconhecida hoje como importante problema de saúde pública, desde que acarreta inúmeras comorbidades associadas, tais como: hipertensão arterial, diabetes *mellitus* tipo 2, doenças cardiovasculares, dentre tantas outras. Muitas dessas condições clínicas estão relacionadas a alterações metabólicas bioquímicas, incluindo distúrbios no metabolismo da glicose, triglicérides e colesterol. Desta forma, além de apresentar eficácia comprovada na redução do peso corporal, um medicamento clinicamente útil para o tratamento da obesidade deveria também promover uma melhoria das condições médicas associadas ao sobrepeso, as quais consistem em fatores de risco aos indivíduos obesos (RADOMINSKI *et al.*, 2012). Tais considerações justificam a investigação das alterações bioquímicas e histopatológicas, induzidas pelo uso da *H. gordonii*, proposta no presente trabalho.

O estresse oxidativo pode ser definido como um distúrbio que ocorre entre o balanço pró-oxidante e antioxidante favorecendo o primeiro, levando a reações potencialmente deletérias em lipídios, proteínas, ácido ribonucléico (RNA) e ácido desoxirribonucléico (DNA). Essas reações podem incluir peroxidação dos ácidos graxos das membranas celulares,

oxidação dos grupos sulfidril e inativação enzimática (WARNER; SHENG & HABERLE, 2004).

Destaca-se que as espécies reativas do oxigênio (EROs) são encontradas em todos os sistemas biológicos. Em condições fisiológicas do metabolismo celular aeróbico, o O_2 sofre redução tetravalente, com aceitação de quatro elétrons, resultando na formação de H_2O . Durante esse processo são formados intermediários reativos, como os radicais superóxido ($O_2^{\cdot-}$), hidroperoxila (H_2O^{\cdot}) e hidroxila (OH^{\cdot}) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Normalmente a redução completa do O_2 ocorre na mitocôndria, e a reatividade das ERO's é neutralizada com a entrada dos quatro elétrons (HALLIWELL & GUTTERIDE, 1990; HALLIWELL, 1992). Quando não controladas, as ERO's atacam muitas moléculas importantes, incluindo enzimas, lipídios de membrana e DNA. O processo de oxidação de ácidos graxos poliinsaturados da membrana celular (lipoperoxidação) pode comprometer a estrutura da membrana, danificando-a ou eventualmente causar uma completa destruição, culminando com a morte celular. Vale salientar que o cérebro é um alvo preferencial do processo peroxidativo, pois apresenta uma grande quantidade de ácidos graxos poliinsaturados (HALLIWELL, 1992; FERREIRA & MATSUBARA, 1997; NAFFAH-MAZZACORATTI *et al.*, 2001).

Sabe-se que os mecanismos de defesa contra as EROS são fornecidos por enzimas como a superóxido desmutase (SOD), catalase, glutaciona-peroxidase (GSH-Px) e glutaciona redutase (GSHRd) e outros agentes antioxidantes como o tripeptídeo glutaciona reduzida (GSH), o ácido ascórbico, a albumina e α -tocoferol (vitamina E), que normalmente mantêm essas espécies sob controle (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1992; FERREIRA & MATSUBARA, 1997; MOSLEY *et al.*, 2006).

A catalase é uma hemoproteína citoplasmática que catalisa a redução do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio (SCOTT *et al.*, 1991). Pode ser encontrada em vários órgãos como o cérebro, sangue, fígado, rim e medula óssea. Sua atividade é dependente de fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina (NADPH). Glutaciona peroxidases (GSH-Px) são as principais enzimas responsáveis pela remoção de peróxido de hidrogênio, formada pela superóxido desmutase (SOD) no citosol e mitocôndria e peróxidos orgânicos para seus correspondentes alcoóis, formados pela conversão da glutaciona reduzida (GSH) a glutaciona oxidada (GSSG) (FERREIRA & MATSUBARA, 1997).

A glutathiona (GSH, L- γ -glutamil-cisteinil-glicina), um tripeptídeo formado por resíduos de glicina, cisteína e ácido glutâmico, existe em concentrações milimolares em todas as células do ser humano e tem outras ações importantes no metabolismo de xenobióticos e na síntese de leucotrienos (HALLIWELL, 1994). GSH pode ser considerada um dos agentes mais importantes do sistema de defesa antioxidante das células, pois protege contra a lesão resultante da exposição a agentes como ferro, oxigênio hiperbárico, radiações ionizantes e luz ultravioleta (FERREIRA & MATSUBARA, 1997). Além de reduzir a suscetibilidade à lesão renal decorrente da isquemia e reperfusão; transporte e reserva de cisteína e detoxificação de agentes químicos e eliminação de produtos da lipoperoxidação, também atua na síntese de DNA, proteínas e algumas prostaglandinas (SHAN *et al.*, 1990).

Dentre os componentes mais atingidos pelo estresse oxidativo está a membrana celular, devido a peroxidação lipídica, que causa alterações na estrutura e permeabilidade das membranas. Conseqüentemente ocorre perda de seletividade na troca de íons e liberação do conteúdo de organelas, como as enzimas hidrolíticas dos lisossomas e formação de produtos citotóxicos como o malonildialdeído (MDA), levando a morte celular. A peroxidação lipídica também contribui para o surgimento do envelhecimento e doenças neurodegenerativas. Entretanto, nem todos esses processos são prejudiciais, pois seus produtos são importantes no processo inflamatório, na reação em cascata com o ácido aracdônico, porém o excesso destes produtos pode ser prejudicial ao organismo (NAKAMURA & LIPTON, 2009).

Os antioxidantes podem atuar em inúmeros aspectos na proteção contra os radicais livres. O mecanismo de defesa primordial é evitar a formação destes radicais, principalmente através da inibição das reações em cadeia com os íons metabólicos como o ferro e o cobre. Os antioxidantes devem ser capazes de inativar os radicais livres gerados pelo metabolismo celular ou por outras fontes exógenas, impedindo dano ao lipídeo, proteína, ácido graxo e DNA, evitando assim as lesões aos constituintes da célula e possivelmente a morte celular (NAKAMURA & LIPTON, 2009).

É importante lembrar que as defesas antioxidantes são afetadas durante o uso de drogas anoréxicas, especialmente pelo aumento de EROS induzido por essas drogas, que, algumas vezes, são consideradas como neurotoxinas (KUO *et al.*, 2009). GALVAN-ARZATE & SANTAMARIA (2002) demonstraram que a dietilpropiona, um agente anoréxico derivado da anfetamina, comercializado no Brasil há mais de 30 anos, pode afetar diferentes substratos neuroquímicos, induzindo mudanças em aminoácidos neuroativos em várias regiões do

cérebro, provavelmente envolvendo a liberação de dopamina. Ainda nesse estudo, por induzir lipoperoxidação, o potencial neurotóxico da dietilpropiona, em parte, foi associado a um aumento de estresse oxidativo.

Embora muitas substâncias naturais sejam isentas de propriedades tóxicas, é largamente reconhecido o potencial tóxico de muitos desses compostos, o que justifica a investigação de alterações histopatológicas e da participação do estresse oxidativo em hipocampo dos animais após o uso repetido de *H. gordonii*, bem como a avaliação de genotoxicidade através do Ensaio Cometa, descrito a seguir.

1.6. Ensaio cometa

O Ensaio Cometa vem sendo utilizado há mais de 20 anos, e desde então é o teste de genotoxicidade mais utilizado e que continua em fase de crescimento. Ele foi elaborado para os estudos de toxicogenética devido a suas peculiaridades e vantagens quando comparado a outros testes para detecção de substâncias genotóxicas. Também conhecido como *Single - cell gel electrophoresis* (SCGE) permite detectar quebra de fitas simples e duplas na molécula de DNA induzidas por substâncias com potencial genotóxico, tais como agentes alquilantes, intercalantes e oxidantes. Combinando a simplicidade da técnica bioquímica de detecção de quebras no DNA com a utilização de poucas células e correspondendo a um ensaio citogenético. As vantagens dessa técnica incluem a sensibilidade na detecção de dano no DNA, a coleta de dados em nível de célula individual, o uso de um número pequeno de células para a análise, a possibilidade de aplicação em qualquer população de células eucarióticas e, principalmente, a rapidez de resultados (TICE *et al.*, 2000; STANG & WITTE, 2009).

O teste não é utilizado para detectar mutações, mas sim lesões genômicas que, após serem processadas, podem resultar em mutação. É um método de análise de lesões no DNA amplamente utilizado para quantificar seus danos oxidativos e *crosslinks*, apoptose e a genotoxicidade de substâncias químicas como produtos químicos, farmacêuticos, agroquímicos, entre outros. A técnica é sensível para detectar lesões em fita simples de DNA e locais de reparos incompletos, a partir de células individualizadas, colocadas em gel de agarose, lisadas, submetidas à eletroforese e coradas. Uma matriz com um halo fluorescente é

formado por DNA não danificado e que não migrou. A imagem resultante de células com DNA danificado tem a aparência de um cometa, consistindo de uma cabeça (matriz nuclear) e uma cauda (DNA quebrado). A extensão do DNA que migrou está correlacionado com o dano ocorrido (TICE *et al.*, 2000), ou seja quanto maior a cauda, maior o dano causado ao DNA celular (Figura 3).

Os linfócitos são as células bastante utilizadas neste teste, células altamente especializadas, que refletem o estado geral do organismo, são facilmente obtidas em grande número e não necessitam de tratamento, ou seja, cultura celular são diplóides e quase todas se encontram na mesma fase do ciclo celular. Os linfócitos são isolados por centrifugação, um processo pelo qual retém os linfócitos, enquanto as outras células passam (COLLINS *et al.*, 2008).

O presente estudo buscou investigar o efeito do teste cometa em linfócitos humanos que foram tratados previamente com *Hoodia gordonii*.



FIGURA 3. Classe de danos das “células-cometa” (Adaptado de Villela et al., 2006). A “cabeça” representa o núcleo original e a “cauda” os fragmentos de DNA. Fonte da Figura: Adaptado de <<http://www.clicrbs.com.br/rbs/image/3494820.jpg>>.

RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA

2. RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA

Atualmente, tem-se observado uma elevação dos índices de excesso de peso corporal e da obesidade no mundo, afetando aproximadamente 1,5 bilhões de indivíduos com sobrepeso e 500 milhões de obesos no mundo (WHO, 2011). A obesidade é caracterizada como uma doença crônica, multifatorial, e atualmente representa um dos maiores desafios de saúde pública em todo o mundo. O panorama brasileiro tem revelado que as prevalências de sobrepeso e obesidade cresceram de maneira alarmante nos últimos anos, representando 52,6% para os homens e 44,7% para mulheres (SOCIEDADE BRASILEIRA DE ENDOCRINOLOGIA E METABOLOGIA, 2014). Associado à estas condições clínicas, tem-se o surgimento de comorbidades como *Diabetes mellitus*, hiperlipidemia, hipertensão arterial, doenças degenerativas e algumas formas de câncer (BRAY, 2004).

Nos últimos anos, um corpo esbelto vem sendo bastante cultuado pela mídia e sociedade em todo o mundo, estando associado à imagem de poder, beleza e mobilidade social e esses fatores socioculturais tendem a afetar principalmente as mulheres (ANDRADE & BOSI, 2003). Diante desta situação, observa-se atualmente uma busca incessante por métodos rápidos de perda de peso, muitas vezes, mesmo sem uma justificativa clínica e racional.

Dentre os grupos de fármacos antiobesidade comercializados no Brasil, os derivados anfetamínicos estão entre os mais usados, porém, também estão freqüentemente envolvidos com o abuso e possuem restrições e contra-indicações de uso, podendo levar ao surgimento da tolerância, dependência química e síndrome de abstinência (WIRTH, 2009). Mesmo diante deste cenário polêmico, o Brasil está entre os três países que lideram o consumo de medicamentos anorexígenos no mundo, o que justifica a busca incessante por novos fármacos eficazes e seguros destinados a este fim. Nesse contexto, a medicina tradicional, utiliza de fontes naturais como plantas, que oferecem um potencial inesgotável para o desenvolvimento e descoberta de novos medicamentos, muitas vezes, mais seguros, baratos e inovadores. Entretanto, substâncias oriundas de plantas são também dotadas de efeitos colaterais, contra-indicações e toxicidade, sendo necessário, portanto, a realização de estudos que comprovem a eficácia e segurança de seu uso.

Os resultados de estudos preliminares sobre as propriedades anorexígenas da *Hoodia gordonii* são considerados notavelmente promissores. No entanto, devido à escassez de estudos científicos que comprovem a sua eficácia e segurança, associada ao fato de que a manipulação de produtos derivados dessa espécie está atualmente proibida no nosso país.

Este fato justifica a proposta da presente pesquisa, que visa contribuir com informações referentes à administração repetida do extrato de *Hoodia gordonii* em ratos e camundongos, no que concerne a alterações comportamentais, bioquímicas, neuroquímicas, histopatológicas e de genotoxicidade, que poderá futuramente beneficiar as pessoas que apresentam sobrepeso ou àquelas que são obesas.

OBJETIVOS

3.OBJETIVOS

3.1 Geral

Investigar possíveis alterações comportamentais, neuroquímicas e metabólicas em roedores tratados com *Hoodia gordonii* em diferentes tempos de tratamento.

3.2 Específicos

Verificar a variação de peso corporal, de *food intake* (consumo de alimento) e *water intake* (consumo de água) durante o tratamento, com *Hoodia gordonii*;

Avaliar o efeito de *H. gordonii* em roedores submetidos aos testes LCE, CA e NF, durante 1, 8 e 15 dias de tratamento;

Investigar os possíveis mecanismos envolvidos na ação farmacológica observada no teste do nado forçado, utilizando antagonistas específicos do sistema monoaminérgico;

Quantificar os níveis de monoaminas em corpo estriado de camundongos durante o tratamento com *Hoodia gordonii* após 1, 8 e 15 dias através da técnica de HPLC (*High Performance Liquid Chromatograph*);

Investigar o efeito de *H. gordonii* sobre marcadores do estresse oxidativo (catalase, peroxidação lipídica, nitrito e GSH) em hipocampo de camundongos;

Determinar a concentração de glicose, triglicérides, colesterol total e a atividade das transaminases em soro de ratos tratados com *H. gordonii*;

Avaliar a toxicidade oral aguda de *Hoodia gordonii* em camundongos, de acordo com o guia OECD 425/2001;

Avaliar a genotoxicidade em linfócitos humanos.

MATERIAIS E MÉTODOS

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram utilizados ratos *Wistar* (180-230g) e camundongos *Swiss* (25-35g) adultos, do sexo masculino (n=8), provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará. Os animais foram mantidos em caixas de propileno em uma sala com a temperatura de 25 ± 1 °C e submetidos ao ciclo claro/escuro de 12 em 12 h, recebendo ração do tipo Purina e água *ad libitum*.

Os experimentos foram realizados de acordo com o guia de cuidados e usos de animais de laboratório do Departamento de saúde e serviços humanos dos Estados Unidos da América (EUA) e aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisas Animais da Universidade Federal do Ceará (UFC) com protocolo número 05/12.

4.2. Droga

O desenvolvimento da pesquisa utilizou o extrato seco de *Hoodia gordonii*, já disponível no Laboratório de Neurofarmacologia (LNF) da Universidade Federal do Ceará, o qual foi procedente da China e importado pela empresa Pharma Nostra Comercial LTDA. Os resultados da análise constataram que o extrato seco de *Hoodia gordonii* apresentava-se em uma concentração de 20:1, com o princípio ativo patenteado pela Phytopharm (P57), e encontrava-se livre de contaminações microbiológicas, estando assim, apto ao consumo. A compra da substância foi devidamente realizada para fins de pesquisa.

Para o preparo da droga teste, a substância foi emulsificada em 0,3% de Tween 20 (Sigma-USA) e diluída em água destilada para a obtenção de doses finais de 25 e 50 mg/kg, administrado por via oral. A escolha da dose foi baseada em estudo realizado em nosso laboratório (MOURA, 2010). Os controles receberam veículo (solução salina a 0,9%, 10 mL/kg).

4.3 Drogas e Reagentes

Quadro 1 – Apresentação das drogas e reagentes

Drogas/Reagentes	Origem
Água Destilada	Deionizador
Álcool etílico P.A.	Quimex, Brasil
Bupropiona	Sigma
Diazepam	União Brasil Química
Doxorrubicina	Sigma
Eosina	Sigma
Fluoxetina	Sigma
Hematoxilina	Sigma
Imipramina	Geisy
Ioimbina	Sigma
NAN - 190	Sigma
Ondansetrom	Sigma
PCPA	Sigma
Prazosina	Sigma
Ritanserina	Sigma
SCH 23390	Sigma
Sulpirida	Sigma
Tween 80	Sigma

4.4 Principais Equipamentos utilizados

Quadro 2 – Apresentação dos principais equipamentos utilizados

Equipamentos	Origem
Aagitador de tubos	Modelo 251, FANEN, SP, Brasil
Balança Analítica	Modelo H5, Mettler, Suíça
Balança para animais	Filizola, Brasil
Banho Maria	Modelo 102/1, FANEN SP, Brasil
Bomba para HPLC	LC 10 AD, Shimadzu Corp., Japan
Campo Aberto	Fabricação não industrial terceirizada
Centrífuga refrigerada	Modelo Marathon 26 KMR, Fisher Scientific
Cronômetro	Incoterm, Brasil
Cubetas de quartzo	Hellma
Deionizador	USF, Elga, USA
Detector eletroquímico	L-ECD-6 ^a , Shimadzu Corp., Japan
Eppendorf	Eppendorf
Espectrofotômetro	Modelo Beckman DU 640B, Fullerton, CA, USA
Freezer a – 70 °C	Modelo ULT 2586-3D14, Revco Scientific, Inc. Asheville, N.C. ,USA
Homogeneizadores manuais	Bellico, USA
Labirinto em cruz elevado	Fabricação não industrial terceirizada
Lâminas de vidro	Global Trade
Medidor de pH, modelo B374	Micronal, SP, Brasil
Microscópio com imunofluorescência	Nikon Instruments
Pipetas Automáticas	H.E., Dinamarca
Recipiente do Nado Forçado	Fabricação não industrial terceirizada
Sonicador	Modelo PT 10-35. Brinkmann Instruments Inc., USA
Vidrarias	Pirex, Brasil

4.5 Tratamento dos animais e Procedimento experimental

Os animais, ratos e camundongos, foram tratados com *Hoodia gordonii* nas doses de 25 e 50mg/kg, v.o., durante 15 dias consecutivos. Grupos de ratos foram pesados antes do início do tratamento e diariamente (por 15 dias), com o intuito de se observar a variação de peso, bem como o monitoramento (pesagem e troca) da comida (*food intake*) e água (*water intake*) dos animais. A quantidade de comida (300mg) diária foi predefinida, bem como da quantidade de água (1000ml).

Outros grupos de animais, camundongos foram tratados via oral com o extrato, para investigação das ações comportamentais. Neste caso, as alterações foram avaliadas 60 minutos após o 1º, 8º e 15º dia de administração da droga teste. Para isto, foram utilizados os testes de “labirinto em cruz elevado (Plus maze)”, “atividade locomotora espontânea (ALE)” e “nado forçado”, para a investigação de possíveis efeitos de ansiedade e/ou depressão.

Para realização da análise neuroquímica, animais receberam *H. gordonii*, via oral, e, após 1, 8 e 15 dias foram sacrificados, sendo as estruturas hipocampo e corpo estriado retiradas para os testes neuroquímicos. Os níveis das monoaminas (NA, DA e 5-HT) e seus metabólitos (DOPAC, HVA e 5-HIAA), foram, então, determinados utilizando HPLC. Outro teste realizado foi o estresse oxidativo em hipocampo de camundongos, através da análise da atividade da enzima catalase, peroxidação lipídica, nitrito e GSH.

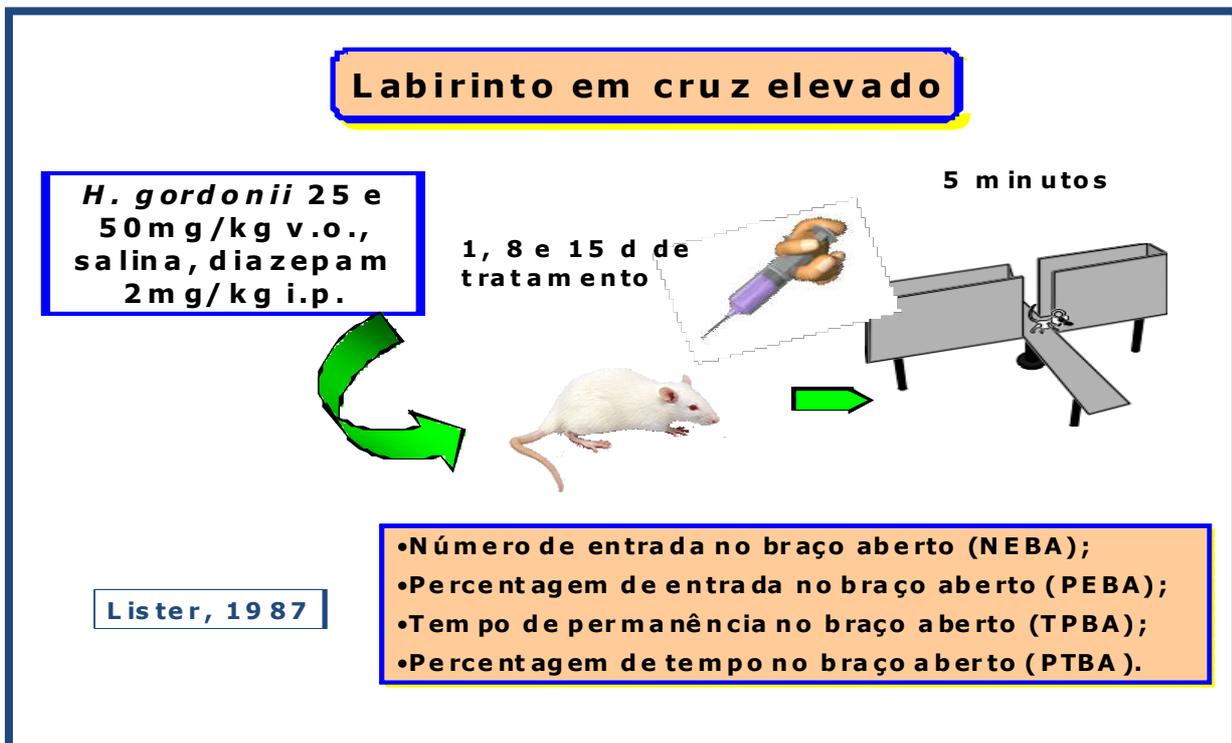
Na realização da análise bioquímica foram utilizados ratos, os quais foram tratados com o extrato nas doses de 25 e 50mg/kg por 15 dias e nos períodos determinados (0,1,8 e 15 dias de tratamento) o sangue foi coletado. No teste de toxicologia foram utilizados camundongos, que foram tratados com uma única dose de 550 e 2000mg/kg e observados por 14 dias e em seguida removidos o rim, fígado e hipocampo para avaliação histopatológica. Para este teste foi seguido o protocolo do OECD 425/2001. A dose de 175 mg/kg não foi utilizada, pois estudo de Moura (2010) utilizou a dose de 200mg/kg e os animais que receberam esta dose apresentaram resultados semelhantes a doses anteriores. E por último foram realizados o teste de citotoxicidade e genotoxicidade em linfócitos humanos. Todos estes experimentos estão descritos adiante.

4.6 Testes comportamentais

4.6.1 Teste do *Plus Maze* (Labirinto em Cruz Elevado - LCE)

O LCE apresenta dois braços abertos (30 x 5 cm) e dois braços fechados (30 x 5 x 25 cm) dispostos perpendicularmente (LISTER, 1987). A plataforma, paredes laterais dos braços fechados são confeccionadas em acrílico transparente e o chão em acrílico preto. O aparato encontra-se a uma altura de 45 cm do chão. Após os períodos de tratamento determinados no presente projeto, os animais foram colocados no centro do aparelho com a cabeça voltada para um dos braços fechados e o seu comportamento observado por 5 min. As medidas comportamentais registradas no LCE são: número de entradas e o tempo despendido nos braços abertos e nos fechados (Quadro 3). Para análise estatística dos dados e confecção dos gráficos a percentagem de entrada nos braços abertos é calculada dividindo-se a frequência de entradas nos braços abertos pela frequência total de entradas, e esse índice multiplicado por 100. Da mesma forma é calculada a percentagem do tempo em que os animais permanecem nos braços abertos.

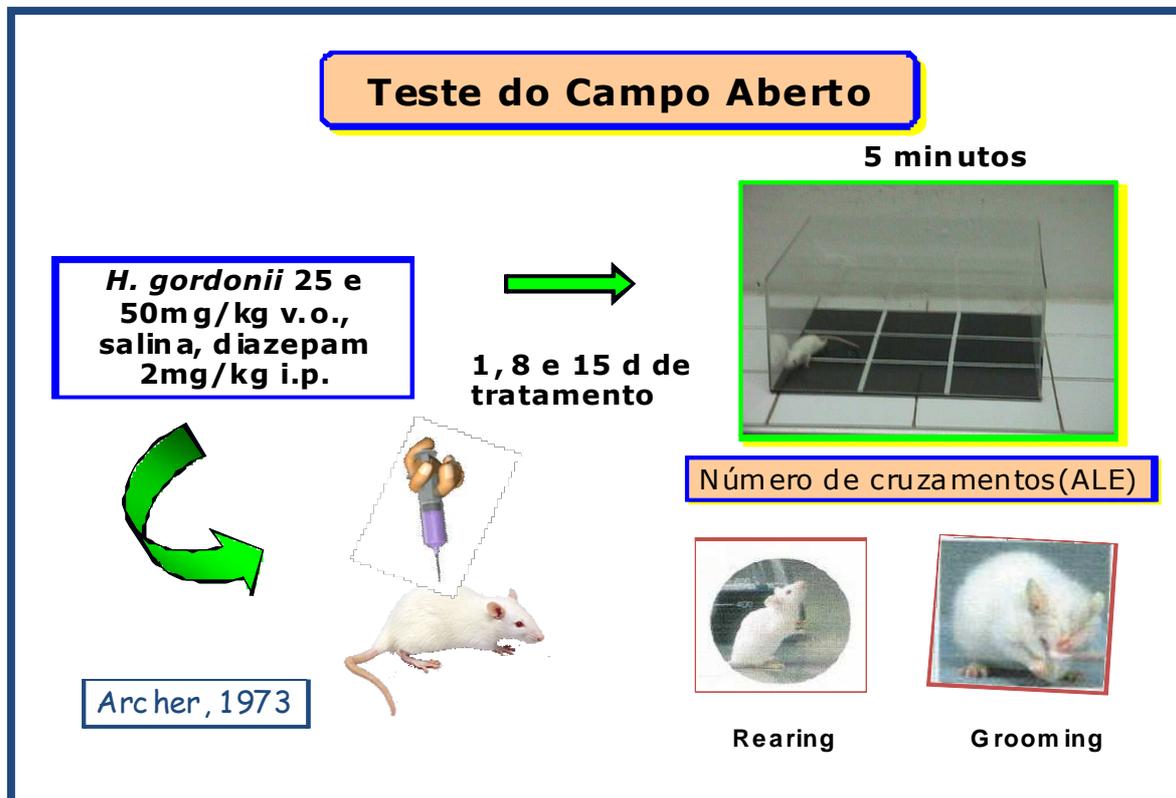
Quadro 3- Esquema do teste Labirinto em cruz elevado



4.6.2 Teste do Campo Aberto

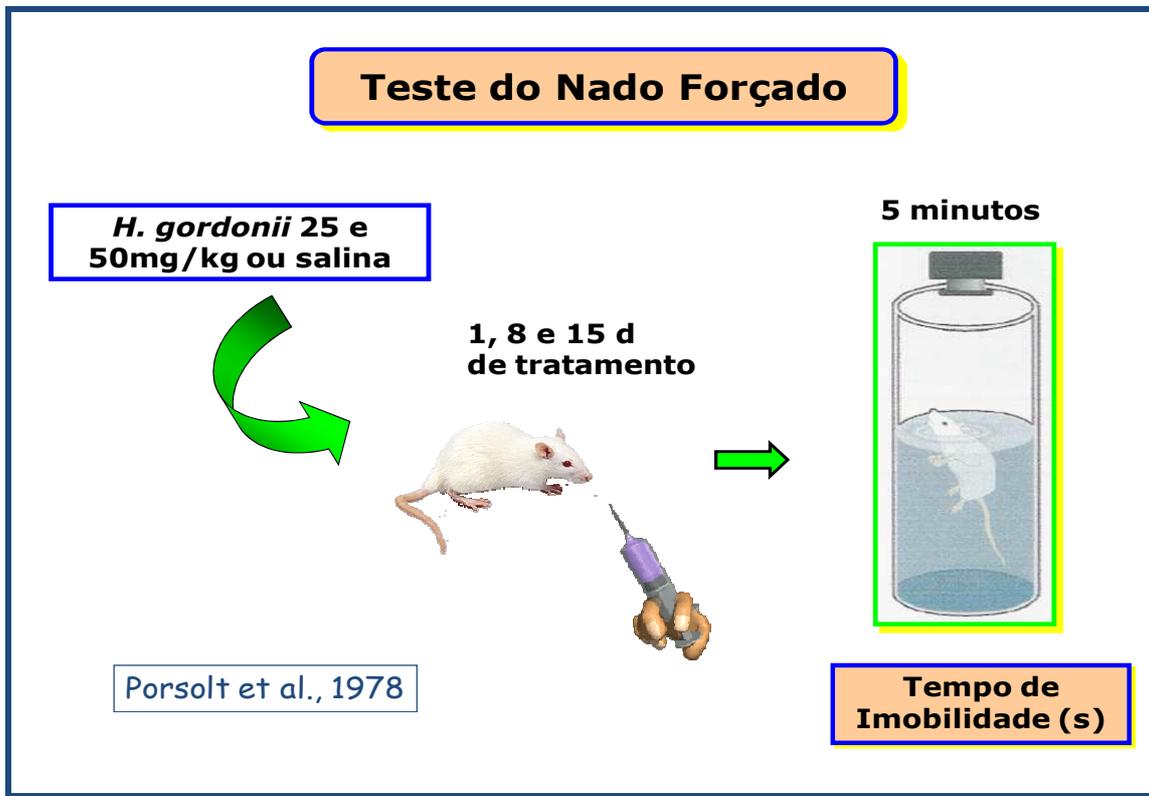
O presente experimento é utilizado para avaliar a atividade exploratória do animal (ARCHER, 1973). Os animais foram colocados em um campo aberto, com área de 30 x 30 x 15 cm e dividido em 9 quadrantes iguais. Os animais foram devidamente tratados com *Hoodia gordonii* v.o. e após 1, 8 e 15 dias de administração submetidos ao teste durante 5 minutos. O parâmetro para observação é o número de cruzamentos com as quatro patas (movimentação espontânea ou atividade locomotora espontânea/ALE), registrados durante um período de 5 minutos, e quantidades de *rearing* e *grooming* (Quadro 4).

Quadro 4 – Esquema do teste do Campo aberto



O experimento, descrito por Porsolt e colaboradores (1978), inclui duas exposições a um tanque de água (22 cm de diâmetro e 40 cm de altura), espaçadas de 24 horas. Foi colocada água fresca a 25°C até a metade do tanque, cerca de 20 cm. Após 60 min de tratamento com *H. gordonii*, os animais foram colocados um por vez no tanque, no qual o tempo de imobilidade foi cronometrado por 5 minutos. O animal foi considerado imóvel quando permaneceu flutuando na água, fazendo movimentos suaves necessários para manter a cabeça acima do nível de água.

Quadro 5- Esquema do teste Nado forçado



4.7 Envolvimento dos sistemas monoaminérgicos (dopamina, noradrenalina e serotonina)

As drogas utilizadas para avaliar o mecanismo de ação relacionado ao teste do nado forçado foram: Bupropiona (BUP) 30 mg/kg (Geisy, São Paulo, SP, Brazil), imipramina (IMI) 10mg/kg (Geisy, São Paulo, SP, Brazil), prazosina (PZS) 1 mg/kg (Sigma, USA), ioimbina 1 mg/kg (Sigma, USA), SCH23390 15 mg/kg (Sigma, USA), sulpirida 50 mg/kg (Sigma, USA), p-chlorophenylalanina methyl ester (PCPA) 100 mg/kg (Sigma, USA), ondansetron (Ondan) 1mg/kg (Sigma, USA), ritanserina 1mg/kg (Sigma, USA), fluoxetina 35mg/kg (Sigma, USA), NAN 190 0,5mg/kg (Sigma, USA). Todas estas drogas foram administradas intraperitonealmente (i.p.) (MELO *et al.*, 2011; MELO *et al.*, 2013).

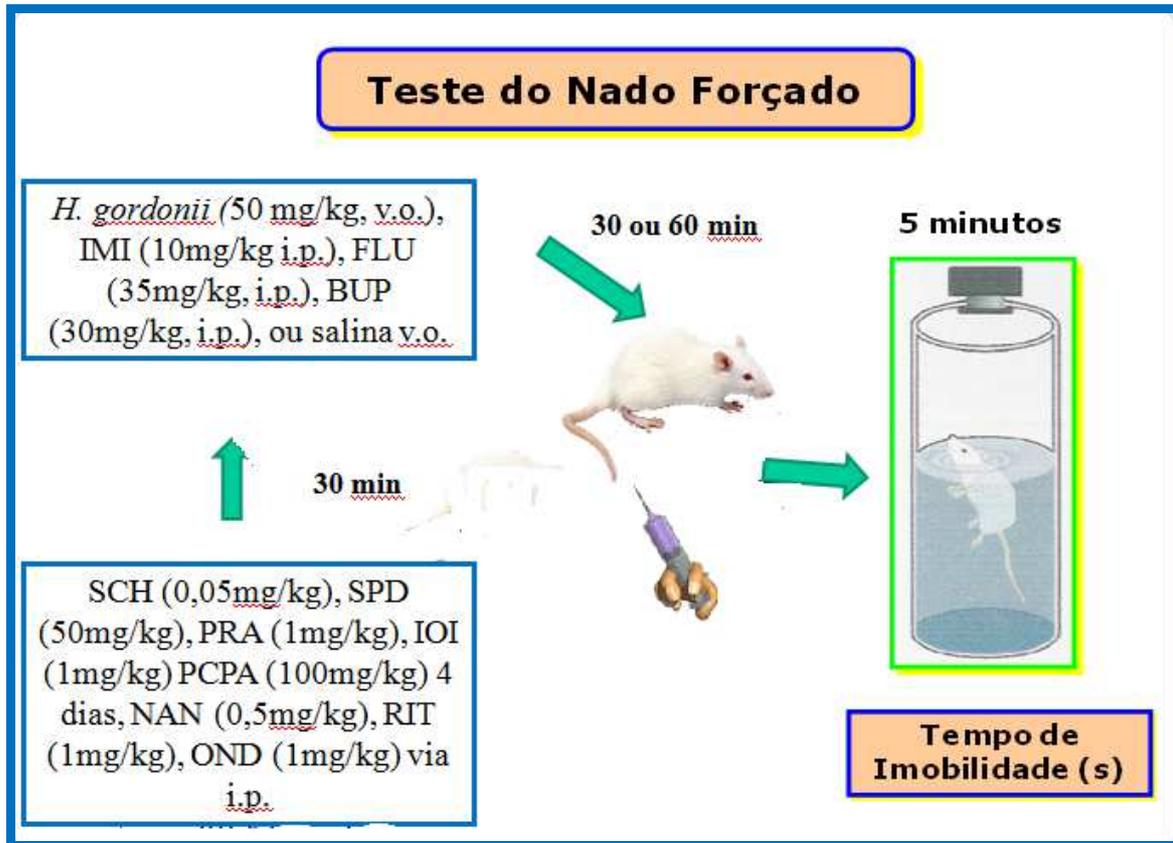
O presente estudo investigou o possível envolvimento do sistema dopaminérgico, para isto os camundongos foram pré-tratados com SCH23390 (0,05 mg/kg, i.p., um antagonista do receptor dopaminérgico D₁), ou sulpirida (50 mg/kg, i.p., um antagonista do receptor dopaminérgico D₂), e após 30 minutos do tratamento foi administrado *Hoodia gordonii* (50

mg/ kg), bupropiona (30mg/kg) ou veículo por via oral e após 1h os animais foram submetidos ao teste do nado forçado.

Em relação ao sistema noradrenérgico foi administrada nos animais a prazosina (1 mg/kg, i.p., um antagonista do receptor α 1- adrenérgico), ioimbina (1 mg/kg, i.p., um antagonista do receptor α 2- adrenérgico) em outro grupo, e após 30 minutos do tratamento foi administrado *Hoodia gordonii* (50 mg/ kg), imipramina (10mg/kg, i.p.), ou veículo, por via oral, e após 1h, os animais foram submetidos ao teste do nado forçado.

Para avaliar o envolvimento do sistema serotoninérgico no teste do nado forçado, os animais foram pré-tratados com PCPA (100 mg/kg, i.p., um inibidor da síntese de serotonina) ou salina, 1 vez ao dia por 4 dias consecutivos (MACHADO *et al.*, 2007). E após 24 h da última dose de PCPA ou injeção de salina, os camundongos receberam *Hoodia gordonii* (50 mg/kg) ou salina e foram submetidos ao teste do nado forçado após 1 h de administração do extrato. Outro grupo foi tratado com NAN-190 (NAN: 0,5mg/kg, i.p.), antagonista do receptor 5HT_{1A}, ritanserina (RIT: 4 mg/kg, i.p.), antagonista do receptor 5HT_{2A} e ondansetron (OND: 0,1mg/kg, i.p.), antagonista do receptor 5HT_{3A} e após 30 min foi administrado *Hoodia gordonii* (50 mg/ kg). Um grupo diferente foi tratado com fluoxetina (35 mg/kg, i.p.), após tratamento com PCPA e, 30 min depois, foi submetido ao teste do nado forçado (Quadro 6).

Quadro 6 – Esquema de tratamento com antagonistas monoaminérgicos



4.8 Protocolo dos experimentos neuroquímicos

4.8.1 Dissecção das áreas cerebrais (hipocampo e corpo estriado)

Para a realização do estudo neuroquímico, as áreas cerebrais hipocampo e corpo estriado foram dissecadas de camundongos. Os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e, em seguida, os encéfalos retirados e colocados sobre papel alumínio numa placa de petri com gelo. Acompanhando a fissura sagital mediana, a camada cortical cerebral foi liberada das leptomeninges com a ajuda de uma pinça reta de microdissecação que divulsionou o córtex delicadamente, em toda a sua extensão frontooccipital. O córtex já divulsionado foi rebatido para os lados, expondo parte do hipocampo que, divulsionado, foi deslocado e retirado.

O corpo estriado (caudado, putâmen e globo pálido) foi isolado das estruturas circunjacentes por divulsionamento com uma tesoura de microdissecação, sendo a sua retirada

orientada pelo diâmetro da porção tuberosa visível desses núcleos, após o rebatimento lateral do córtex.

Terminada a dissecação, cada área foi colocada em papel de alumínio, sob gelo, pesada e armazenada a -10°C para uso posterior. Quando necessária a estocagem por certo período de tempo (no máximo 2 meses) os tecidos são considerados como tendo a mesma viabilidade para experimentação que os ensaiados 24h após a dissecação (BURKE & GREENBAUN, 1987).

4.8.2 Determinação da concentração de monoaminas e seus metabólitos com HPLC

- Método

Para a determinação dos níveis de catecolaminas foi utilizado o equipamento de HPLC (*Cromatografia Líquida de Alta Performance*). Na cromatografia líquida clássica, um adsorvente (alumina ou sílica) é empacotado em uma coluna e é eluído por um líquido ideal (fase móvel). Uma mistura para ser separada é introduzida na coluna e é carregada através da mesma por um líquido eluente (fase móvel). Se um composto da mistura (soluto) é adsorvido fracamente pela superfície da fase sólida estacionária, ele atravessará a coluna mais rapidamente que outro soluto que seja mais fortemente adsorvido. Então, a separação dos solutos é possível se existem diferenças na adsorção pelo sólido. Os detectores eletroquímicos medem a condutância do eluente ou a corrente associada com a oxidação ou redução dos solutos. Para ser capaz de detectar no primeiro caso, os solutos devem ser iônicos e no segundo caso, os solutos devem ter a característica de serem relativamente fáceis de oxidarem ou reduzirem.

Detectores eletroquímicos que medem corrente associada com a redução ou oxidação de solutos são chamados detectores amperométricos ou coulométricos. Neste estudo foi utilizado o tipo amperométrico que reage com uma quantidade muito menor de soluto, em torno de 1 %. Todas as técnicas eletroquímicas envolvem a aplicação de um potencial para um eletrodo (geralmente de carbono vítreo), oxidação da substância que está sendo estudada próximo à superfície do eletrodo seguindo a amplificação e medida da corrente produzida. As

catecolaminas são oxidadas nos grupos de anel hidroxil para produzir um derivado ortoquinona com a liberação de dois elétrons.

- Procedimento Experimental

Os animais foram decapitados 60 minutos após a administração da *Hoodia gordonii*, logo após tiveram seus cérebros dissecados sobre gelo. O corpo estriado foi utilizado para preparar homogenatos a 10% (20mg área/100µl tampão). Os tecidos cerebrais foram homogeneizados em ácido perclórico (HClO₄) e centrifugados por 15 minutos em centrífuga refrigerada (4°C) a 15.000 rpm. Uma alíquota de 20 µL do sobrenadante foi, então, injetada no equipamento de HPLC, para a análise química.

Para a análise das catecolaminas, uma coluna BDS HYPERSIL C18 com comprimento de 250 mm, calibre 4,6 mm e de partícula de 5 µm, da Thermo Scientific, foi utilizada. A fase móvel utilizada é composta por tampão ácido cítrico 0,163 M, pH 3,0, contendo ácido octanosulfônico sódico(SOS) 0,69 M, como reagente formador do par iônico, acetonitrila 4 % v/v e tetrahidrofurano 1,7 % v/v. NA, DA, DOPAC, HVA, 5-HT e 5-HIAA foram eletronicamente detectados usando um detector amperométrico (Modelo L-ECD-6A da Shimadzu, Japão), pela oxidação em um eletrodo de carbono vítreo fixado em 0,85V relativo a um eletrodo de referência de Ag-AgCl (HALLMAN & JONSSON, 1984).

- Soluções Reagentes

Fase Móvel

Para preparar um volume de 500 mL de fase móvel foram pesados 15,75 g de ácido cítrico (Grupo Química, RJ, Brasil) e 0,292 g de Cloreto de Sódio (Grupo Química, RJ., Brasil) completado para um volume de 400 mL com água puríssima (Milli-Q). Esta solução foi ajustada para pH 3,0 com hidróxido de sódio 12,5 M (Reagen, RJ, Brasil). A esta solução foi adicionado o SOS 75 mg (Sigma, MO, USA) e completado o volume para 470 mL com água Milli-Q. Em seguida, foi procedida a filtração e degaseificação, e posteriormente adição de 20 mL de acetonitrila (Carlo Erba Reagenti, MI, Itália) e 10 mL de tetrahidrofurano (Sigma, MO, USA) para um volume final de 500 mL.

Ácido Perclórico 0,1 M

Adiciona-se 1,8 mL de ácido perclórico (Sigma, MO, USA) em um balão volumétrico e o volume ajustado para 300 mL.

Padrões

Os padrões foram preparados em uma concentração final de 4 ng/20 μ L de solução de NA, DA, 5-HT, DOPAC, HVA e 5-HIAA (Sigma, MO, EUA). A partir da área dos picos desses padrões, as concentrações das amostras foram calculadas utilizando o programa Microsoft Excel® e os resultados foram expressos em mmol/g de tecido.



FIGURA 4 - Aparelho de HPLC com detecção de fluorescência e eletroquímica.

4.8.3 Estresse oxidativo

Grupos de camundongos foram tratados com *Hoodia gordonii* por 01, 08 e 15 dias e, 01 hora após a última administração a área cerebral hipocampo foi retirada para avaliação do estresse oxidativo. Os seguintes testes foram realizados: estudo da atividade da enzima catalase, dosagem de malonildialdeído, concentração dos níveis de nitrito e determinação da concentração da glutatona reduzida (GSH).

4.8.3.1 Avaliação dos níveis de peroxidação lipídica (dosagem de malonildialdeído)

A dosagem de malonildialdeído foi realizada conforme descrito anteriormente por Huang e colaboradores (1998). Imediatamente após dissecação dos tecidos, os hipocampos foram homogeneizados em tampão fosfato 0,05 M, pH 7,0 a 10 % (peso/volume). Após obtenção dos homogenatos, uma alíquota de 250 µl de cada homogenato incubada a 37 °C por 1 h. Após o período de incubação, foi acrescentado aos homogenatos 400 µl de ácido perclórico a 35% e, em seguida, a mistura foi centrifugada durante 20 min a uma rotação de 14.000 rpm. Após centrifugação o sobrenadante foi separado e acrescido a este 200 µL de ácido tiobarbitúrico 1,2 %. Após agitação essa mistura foi mantida em banho maria com água fervente (100 °C) por 30 min e logo em seguida à retirada do banho maria foi colocada em um banho de gelo para o retorno da reação à temperatura ambiente. A leitura foi feita em espectrofotômetro com comprimento de onda ajustado para 532 nm. Como padrão foi utilizado várias concentrações de MDA (0,627 a 16,77 µmol). Os resultados foram expressos como µmol/mg de proteína. As proteínas foram determinadas utilizando o método de Lowry *et al.* (1951).

4.8.3.2 Avaliação da atividade da enzima catalase

A atividade da catalase mede a capacidade de produção de O₂ e H₂O à medida que H₂O₂ é hidrolisado (MAEHLI & CHANCE, 1954).

Imediatamente após a dissecação dos tecidos, os hipocampos foram homogeneizados em tampão fosfato 0,05 M, pH 7,0 a 10 % (peso/volume). O primeiro passo para determinação da atividade da catalase é o preparo do meio de reação que é constituído por 9

mL de peróxido de hidrogênio diluído em água destilada (1/1000) em 0,5 mL de tampão tris-HCl 1 M EDTA 5mM, pH 8 e 0,5 mL de água mili Q. Após centrifugação de 40 µL de homogenato a 14.000 rpm por 30 min, uma amostra de 20 µL foi adicionada a 980 µL do meio de reação. Após 1 min e 6 min as absorvâncias inicial e final foram registradas, respectivamente a um comprimento de onda de 230 nm. A curva padrão foi feita utilizando catalase purificada (Sigma, MO, USA) sob condições idênticas às do ensaio. As proteínas foram determinadas utilizando o método de Lowry *et al.* (1951).

4.8.3.3 Determinação da concentração da glutathiona reduzida (GSH)

A determinação da concentração da GSH baseia-se na reação do reagente de Ellman, o 5,5'-ditiobis (ácido 2-nitrobenzóico) (DTNB) com o tiol livre originando um dissulfeto misto mais ácido 2-nitro-5-tiobenzóico. A medida do produto de reação formado foi realizada por leitura da absorvância a 412 nm, conforme descrito anteriormente por Sedlak & Lindsay (1968), com poucas modificações. Imediatamente após dissecação dos tecidos, os hipocampos foram homogeneizados em EDTA a 10 % (peso/volume). Em seguida, foi retirado 400 µL desses homogenatos e adicionado 320 µL de água destilada e mais 80 µL de ácido tricloroacético a 50%. O material foi agitado e centrifugado a 3.000 rpm por 15 min (para os hipocampos) e 6.000 rpm por 20 min (para os fígados). Em seguida, foi recolhido 400 µL do sobrenadante e acrescido 800 µL de tampão Tris-HCl 0,4 M, pH 8,9 e mais 20 µL de DTNB 0,01 M. Após 1 minuto da reação, foi realizada a leitura da coloração em 412 nm, através de um espectrofotômetro Beckman DU, acoplado a um sistema de modernização da Gilford, USA, o qual permite a leitura automática em sistema digital, com maior sensibilidade. A concentração da glutathiona reduzida é expressa em nanograma de GSH por grama de tecido. As proteínas foram determinadas utilizando o método de Lowry *et al.* (1951).

4.8.3.4 Dosagem de proteína (Método de Lowry)

A quantidade de proteína em homogenatos de hipocampo foi determinada a 25 °C utilizando albumina sérica bovina como padrão, de acordo com o método previamente descrito (LOWRY *et al.*, 1951), que utiliza duas reações de formação de cor para analisar a

concentração proteica fotometricamente. Inicialmente é feita uma reação biureto de baixa eficiência na qual os íons de cobre alcalino produzem uma cor azulada na presença de ligações peptídicas. Esta cor biureto é característica de todas as proteínas e fornece uma cor básica de fundo para a próxima etapa de ensaio. Depois o método emprega uma mistura complexa de sais inorgânicos, o reagente Folin-Ciocalteau que produz uma cor verde azulada intensa na presença de tirosina ou triptofano livres ou ligados a proteínas. Como as quantidades desses dois aminoácidos são geralmente constantes nas proteínas solúveis, com poucas exceções, a cor das reações (verde-azulada) é indicativa da presença de proteína e a intensidade da cor proporcional à concentração. Esta coloração foi medida em 750 nm, através de espectrofotômetro Beckman DU 640B, acoplado a um sistema de modernização da Gilford, USA. Esta dosagem foi realizada com o mesmo homogenato confeccionado para cada uma das dosagens de peroxidação lipídica, GSH e catalase.

4.8.3.5 Determinação dos níveis de nitrito/nitrato

Foram pesados 7mg de NaNO_2 e dissolvidos em 10 mL de água bidestilada (estoque - 10mM) foram feitas diluições em série (10 a 20x), ficando 1mM, 100 μM , 10 μM , 5 μM , 2,5 μM , 0,625 μM e 0,312 μM . Foi feita uma equação da reta para o cálculo das concentrações do teste (GREEN *et al.*, 1982).

Foram preparados homogenatos da área cerebral a 10% (p/v) em solução de cloreto de potássio (KCl) 1,15%. Após a centrifugação (800xh, 10 min), os sobrenadantes foram coletados e a produção de NO foi determinada através da reação de Griess. Uma alíquota de 100 μL do sobrenadante foi incubada com 100 μL do reagente de Griess [sulfanilamida 1% em H_3PO_4 1%/ N-(naphthyl)-ethylenediamine 0,1%/ H_3PO_4 1% diluído em água (1:1:1)] a temperatura ambiente por 10 minutos. A absorbância foi medida em espectrofotômetro a 550nm. A concentração de nitrito (μM) foi determinada a partir de uma curva padrão de NaNO_2 . NaNO_2 (Sigma, St Louis, MO, EUA) 7 mg em 10 ml de água bidestilada. Em seguida foi procedida à filtração e a degaseificação, e posteriormente adição de 20 mL de acetonitrila (Carlo Erba Reagenti, MI, Itália) e 10 ml de tetrahidrofurano (Sigma, St Louis, MO, EUA) para um volume final de 500 ml.

4.9 Análises bioquímicas

Os animais foram submetidos a um tratamento com *Hoodia gordonii* nas doses de 25 e 50 mg/Kg, por quinze dias consecutivos. Uma hora após o 1º, 8º e 15º dia de tratamento, as amostras de sangue foram coletadas através da técnica de punção orbital, para a obtenção das amostras de sangue os animais foram anestesiados com éter. Neste experimento, o grupo controle foi utilizado o mesmo animal antes de iniciar o tratamento. Na coleta sanguínea o sangue foi armazenado em eppendorf e em seguida as amostras foram centrifugadas a 3000 rpm por 10 minutos para a obtenção do soro, do qual foram analisados os seguintes parâmetros: glicose, triglicérides, colesterol total, AST e ALT.

4.9.1 Glicose

Metodologia: Enzimático – Glicose Oxidase

Princípio: A glicose oxidase (GOD) catalisa a oxidação da glicose para ácido glucônico e peróxido de hidrogênio. Através de uma reação oxidativa de acoplamento catalisada pela peroxidase (POD), o peróxido de hidrogênio formado reage com 4-aminoantipirina e fenol, formando um complexo de cor vermelha (antipirilquinonimina), cuja absorvância é medida em 505 nm e a intensidade da cor é proporcional à concentração da glicose na amostra.

Os valores foram determinados de acordo com as especificações do fabricante (Labtest®) e expressos em mg/dL.

4.9.2 Triglicérides

Metodologia: Enzimático – Trinder

Princípio: Os triglicérides são hidrolisados pela lipase lipoprotéica e o glicerol liberado é fosforilado pela glicerol quinase, formando glicerol fosfato, que é oxidado a dihidroxiacetona, e água oxigenada por ação da glicerol-3-fosfato oxidase. Através da reação oxidativa catalisada pela peroxidase, a água oxigenada reage com a 4-aminoantipirina e ESPAS, produzindo a antipirilquinonimina, cuja absorvância, medida em 540 nm, é

diretamente proporcional à concentração de triglicéridios.

Os valores foram determinados de acordo com as especificações do fabricante (Labtest®) e expressos em mg/dL.

4.9.3 Colesterol Total

Metodologia: Enzimático – Trinder

Princípio: Os ésteres do colesterol são hidrolisados pela colesterol esterase formando colesterol livre que, após oxidação pela colesterol oxidase, forma peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Este, reagindo com o fenol e 4-aminoantipirina, através de oxidação oxidativa catalisada pela peroxidase, produz uma quinonimina de cor vermelha, cuja absorvância, medida em 500 nm, é diretamente proporcional à concentração de colesterol presente na amostra.

Os valores foram determinados de acordo com as especificações do fabricante (Labtest®) e expressos em mg/dL.

4.9.4 Aspartato Aminotransferase (AST)

Metodologia: Cinética - UV

Princípio: A AST catalisa a transferência do grupo amina do ácido aspártico para o cetoglutarato, com formação de glutamato e oxalacetato. Este é reduzido a malato por ação da malato desidrogenase (MDH), enquanto a coenzima NADH é oxidada a NAD^+ . A consequente redução da absorvância em 340 ou 365 nm, monitorizada espectrofotometricamente, é diretamente proporcional à atividade da enzima na amostra.

Os valores foram determinados de acordo com as especificações do fabricante (Labtest®) e expressos em U/L.

4.9.5 Alanina Aminotransferase (ALT)

Metodologia: Cinética - UV

Princípio: A ALT catalisa a transferência do grupo amina da alanina para o cetoglutarato, com a formação de glutamato e piruvato. Este é reduzido a lactato por ação da lactato desidrogenase (LDH), enquanto a coenzima NADH é oxidada a NAD^+ . A consequente redução da absorbância em 340 ou 365 nm, monitorizada espectrofotometricamente, é diretamente proporcional à atividade da enzima na amostra.

Os valores foram determinados de acordo com as especificações do fabricante (Labtest®) e expressos em U/L.

4.10 Estudo de toxicidade

Grupos de camundongos (n=3) foram tratados com *Hoodia gordonii* por via oral, nas doses 550, ou 2000 mg/kg uma única vez, e um outro grupo foi tratado com salina (controle). O comportamento dos animais foi observado após 30 minutos e após 4 horas de administração do extrato, em seguida os camundongos foram pesados por 14 dias consecutivos e observados para a ocorrência de morte neste período. Decorridos os 15 dias, os animais foram decapitados e seu cérebro (hipocampo), fígado e rim foram removidos para fazer a análise histopatológica. O protocolo utilizado foi o OECD 425 (2001).

Hipocampo, fígado e rim após dissecados foram fixados em paraformaldeído tamponado 10% por 24h. Foi realizado um corte sagital de 5 μm nas áreas utilizadas e fixadas em parafina, logo em seguida coradas com hematoxilina e eosina (H/E), para análise microscópica. A análise histopatológica foi realizada pelo microscópio Nikon com um aumento de 100 e 400x. As observações histológicas no hipocampo foram analisadas de acordo com o escore usado no estudo de GILAT *et al.* (2005). A escala de escores é apresentada abaixo:

- (0) Morfologia normal.
- (1) Dano menor (edema, poucas células pinocíticas).
- (2) Dano moderado (desorganização estrutural, edema, moderadas células pinocíticas, vacuolização, infiltrado inflamatório).
- (3) Dano intenso (desorganização estrutural, edema, quantidade intensa de células pinocíticas, vacuolização, infiltrado inflamatórios).

4.11 Genotoxicidade e citotoxicidade *in vitro*

Nesta etapa do trabalho, buscou-se verificar a citotoxicidade *in vitro* de uma amostra de *Hoodia gordonii*, em linhagens tumorais e em linfócitos humanos.

Células: Os linfócitos foram isolados através de gradiente de densidade (Ficoll-Hypaque) e foram cultivados em meio RPMI 1640, suplementados com 20% de soro fetal bovino, 1% de antibióticos e 4% de fitohemaglutinina. As células foram mantidas em estufa a 37°C e atmosfera contendo 5% de CO₂.

Amostras: As substâncias foram diluídas em DMSO na concentração estoque de 10 mg/mL.

- Métodos

A citotoxicidade foi avaliada pelo método colorimétrico do MTT, e a genotoxicidade foi avaliada pelo método do Cometa (versão alcalina) utilizando linfócitos humanos isolados de quatro doadores voluntários, obedecendo aos seguintes critérios:

- ter entre 18 e 25 anos
- estar em bom estado clínico de saúde
- não fumante e não etilista
- não estar fazendo uso de algum medicamento.

A coleta do material (sangue periférico retirado da veia cefálica ou basílica) foi realizada por profissionais capacitados, nas dependências da UNIFAC (Unidade de

Farmacologia Clínica da Universidade Federal do Ceará - UFC), utilizando seringa esterilizada e descartável.

4.11.1 Teste do MTT

A avaliação do potencial citotóxico dos compostos foi realizada através do método do MTT (MOSMANN, 1983). Este é um ensaio quantitativo *in vitro* que foi desenvolvido para estimação de proliferação e sobrevivência celular. Essa técnica tem a capacidade de analisar a viabilidade e o estado metabólico da célula, sendo assim, bastante útil para avaliar a citotoxicidade.

- Execução do teste

Os linfócitos foram cultivados em multiplacas de 96 cavidades numa densidade de 2×10^6 células/mL. Após 24 h do início da cultura, os linfócitos foram expostos aos compostos durante 24 e 72 h com concentrações variando de 3,12 a 200 µg/mL. Após o período de incubação, as placas foram centrifugadas (15 g/15 min), e o sobrenadante foi descartado. Cada cavidade recebeu 150 µL da solução de MTT (10% em meio RPMI 1640) e foi reincubada durante 3 horas, em estufa a 37°C e a 5% CO₂. Após esse período, as placas foram novamente centrifugadas (30 g/10 min), o sobrenadante foi desprezado, e o precipitado foi ressuspensionado em 150µL de DMSO. Para a quantificação do sal reduzido nas células vivas, as absorbâncias foram lidas com o auxílio do espectrofotômetro de placa, no comprimento de onda de 550 nm.

4.12.2 Teste do Cometa

O teste do cometa, também conhecido como *Single-cell gel electrophoresis* (SCGE) tem sido, rotineiramente, utilizado no estudo do potencial genotóxico de compostos químicos industriais, biocidas, agroquímicos e produtos farmacêuticos (HARTMANN *et al.*, 1997). Nos últimos dez anos, tornou-se um dos principais métodos no estudo de lesões no DNA, com

aplicabilidade em estudos de genotoxicidade, epidemiologia molecular, ecotoxicologia e biomonitoramento populacional (COLLINS, 2004; FAUST *et al.*, 2004).

- Execução do teste

Os linfócitos ($0,5 \times 10^5$ células/mL) foram cultivados na presença de concentrações crescentes (50 a 200 $\mu\text{g/mL}$) da amostra durante 24 horas a 37°C , em atmosfera de 5% de CO_2 . O tampão PBS foi utilizado como controle negativo e a doxurrubicina ($0,6 \mu\text{M}$) foi utilizada como controle positivo.

Após o tratamento, as células foram submetidas à eletroforese em gel de agarose (25 V; 300 mA) durante 20 minutos. Para coloração das lâminas, foi utilizada uma solução de brometo de etídio ($20\mu\text{g/mL}$). As lâminas foram analisadas com o auxílio de microscópio de fluorescência. A análise foi realizada de acordo com o padrão de escores previamente determinados pelo tamanho e intensidade da cauda do cometa. Foram contados 100 cometas por lâmina (LOVELL *et al.*, 1999) e classificados, por análise visual, dentre cinco categorias (0, 1, 2, 3 e 4) que representam a percentagem de DNA na cauda do cometa, indicando o grau de lesão sofrido pela célula.

O índice de dano (ID) foi obtido pela seguinte fórmula: $\text{ID} = \sum_{i=0}^4 n_i \times i$, onde n_i é o número de células com nível de dano i (0, 1, 2, 3 ou 4). Logo, os valores de ID podem variar de 0 (sem dano) a 400 (dano máximo).

4.12 Análise estatística

A análise estatística dos dados foi realizada através do software GraphPad Prism, versão 6.0 (GraphPad Software, San Diego Califórnia EUA). Os resultados que obedecem a uma distribuição paramétrica, foram analisados por Student t, as comparações múltiplas analisadas por Análise de Variância (ANOVA), seguido pelo teste de Student Newman Keuls (*post hoc*), sendo os valores representados pela Média \pm Erro Padrão da Média (EPM). Os dados não-paramétricos foram analisados pelo mesmo programa utilizando o teste Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunns (*post hoc*), sendo os valores representados como mediana + valor mínimo – valor máximo. O critério de significância utilizado foi * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1 Avaliação do peso corporal do animal

Neste teste foi analisado o peso dos animais, o qual foi verificado diariamente, por 15 dias, após administração de *Hoodia gordonii*, por via oral, em ratos, observou-se que a dose de 25mg/kg [14,50±0,98 (8)***], bem como a de 50mg/kg [9,87±0,87 (8)***] reduziram o peso do animal em relação ao grupo controle [27,43±1,44 (8)] (Figura 05). Na tabela 01 encontra-se a redução do peso dos animais, mostrando uma redução na dose de 25mg/kg [213,20±3,52 (8)*] e de 50mg/kg [209,20±1,78 (8)**] em comparação ao controle [224,40±4,09 (8)].

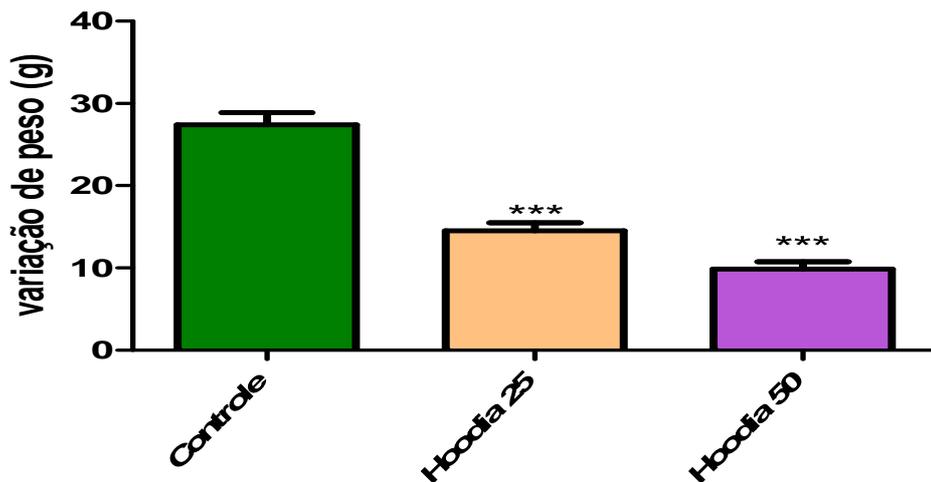


FIGURA 05 – Efeito de *Hoodia gordonii* administrado por via oral na variação do peso em ratos. Controle (veículo) ou *Hoodia gordonii* (25 e 50mg/kg) foram administrados por 15 dias e, diariamente, foi verificado o peso do animal. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguido de Student t Newman Keuls como teste post hoc. Valores significativos: ***p<0,001 versus controle.

Tabela 01- Peso dos animais tratados com *Hoodia gordonii* por 15 dias.

GRUPO	PESO
Controle	224,40±4,09 (8)
H 25	213,20±3,52 (8)*
H 50	209,20±1,78 (8)**

Nota: Controle (veículo) ou *Hoodia gordonii* (25 e 50mg/kg) foram administrados por 15 dias e, diariamente, foi verificado o peso do animal. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguido de Student Newman Keuls como teste post hoc. Valores significativos: *p<0,05; **p<0,01 *versus* controle.

5.2 Avaliação da ingestão de água e comida

A Figura 06A revela a ingestão de água pelos ratos em mL, durante o tratamento com *H. gordonii* por 15 dias. Verificou-se uma redução da ingestão de água em ambas as doses utilizadas 25 (193,30±6,06***) e 50mg/kg (156,55±5,77***), comparados ao grupo controle (225,55±2,61). Resultado significativo foi observado na ingestão de comida (controle: 195,70±6,57; *Hoodia* 25: 172,90±4,01**; *Hoodia* 50: 168,70±2,96**) (Figura 06B).

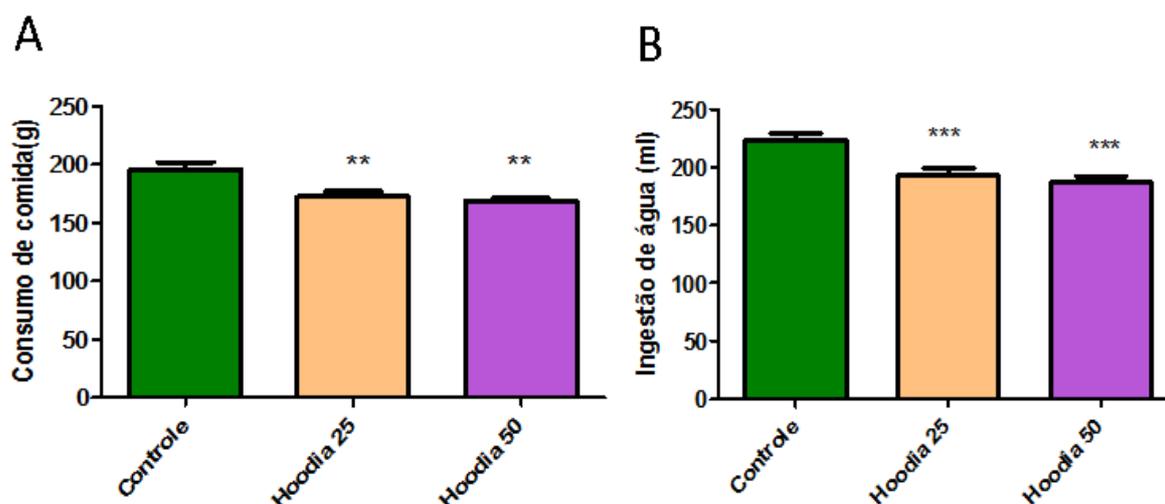


FIGURA 06 - Efeito da administração de *Hoodia gordonii* 25 e 50 mg/Kg sobre o consumo de comida (A) e consumo de água dos animais (B). Controle (veículo) e *H. gordonii* foram administrados por via oral. Foi fornecida uma quantidade de ração pré-definida (200g) e água pré-definida (1000mL) e verificada a quantidade de ingerida pelos animais. Os valores representam a média \pm EPM da variação de comida e água ingerida pelos animais. Para análise estatística foi utilizado o ANOVA seguido por Student Newman Keuls como teste *post hoc* sendo considerado significativo ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

5.3 Estudos comportamentais

5.3.1 Teste do Labirinto em cruz elevado (LCE) para camundongos

Hoodia gordonii (25 e 50mg/kg) foi administrada uma vez em camundongos e, após 60 minutos, foi realizado o teste do labirinto em cruz elevado, no qual os seguintes parâmetros foram analisados: Número de entradas nos braços abertos (NEBA), Percentagem de número de entradas nos braços abertos (PEBA), Tempo de permanência nos braços abertos (TPBA) e Percentagem de tempo de permanência nos braços abertos (PTBA). Pode-se verificar na Figura 07A que houve uma redução do NEBA nas doses de 25mg/kg [$5,57 \pm 0,89$ (8)*] e 50mg/kg [$6,57 \pm 0,64$ (8)*] em comparação com o controle [$9,00 \pm 0,84$ (8)], já o diazepam mostrou um aumento deste parâmetro [$11,38 \pm 0,73$ (8)*]. Na Figura 07B, verifica-se a

percentagem de entrada nos braços abertos (PEBA), na qual não houve alteração nas doses de 25 [39,50±3,56 (8)] e 50mg/kg [35,43±2,13 (8)] em relação ao grupo controle [43,14±3,69 (8)] e com o diazepam [61,50±3,62 (8)***], droga padrão, os animais permaneceram mais tempo. Por sua vez, na Figura 07C observa-se o tempo de permanência nos braços abertos (TPBA), o qual se verificou uma redução nas doses de 25mg/kg [62,83±4,82(9)**] e 50mg/kg [70,83±10,75 (9)**], quando comparado com o controle [101,7±9,06 (9)] e na dose do diazepam 160,80±6,14 (8)***]. E na Figura 07D, a percentagem de tempo no braço aberto houve uma redução estatisticamente significativa nas doses de 25mg/kg [27,20±3,96 (8)**] e 50mg/kg [33,14±2,89 (8)*], em relação ao controle [45,50±3,69 (8)] e um aumento com o diazepam [59,38±3,52 (8)**].

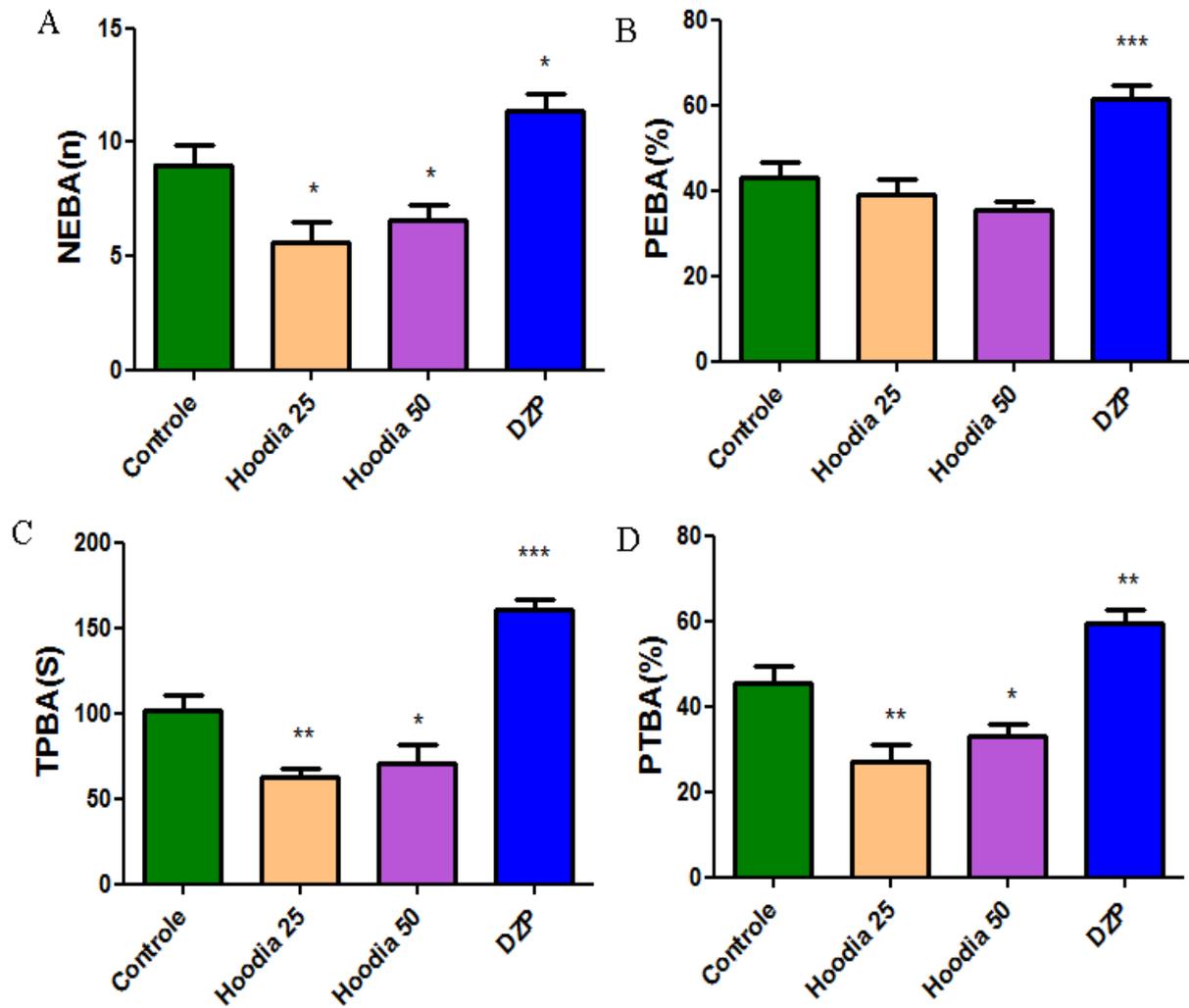


FIGURA 07- Efeito de *Hoodia gordonii* e diazepam (DZP) administrado via oral por 1 dia sobre o número de entrada nos braços abertos (NEBA-A), percentagem de entrada nos braços abertos (PEBA-B), tempo de permanência nos braços abertos (TPBA-C) e percentagem de tempo nos braços abertos (PTBA-D). Controle (veículo), *Hoodia gordonii* (25 e 50 mg/kg, v.o.) e diazepam (2mg/kg i.p.) foram administrados por 1 dia e 30, ou 60 min antes do experimento. Os valores da figura representam a média \pm EPM. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguido por Student Newman Keuls como teste *post hoc*. Valores significativos: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ versus controle.

Em relação ao tratamento de *Hoodia gordonii*, por 08 dias, foi encontrado que a dose de 25 mg/kg [$3,57 \pm 0,57$ (8)*], bem como a de 50mg/kg [$4,57 \pm 0,48$ (8)*] promoveram uma redução do número de entrada nos braços abertos (NEBA), quando comparado ao controle [$7,12 \pm 1,20$ (8)] e com o diazepam [$11,00 \pm 0,62$ (8)***] ocorreu um aumento, na Figura 08A. A figura 08B representa a percentagem de entrada nos braços abertos (PEBA), onde a dose de

25 mg/kg [29,33±2,76 (8)*] e a de 50mg/kg [29,50±1,54 (8)*] também reduziram a percentagem de entrada nos braços abertos (PEBA), quando comparados com controle [41,00±3,33 (8)], diferentemente do diazepam [60,25±2,96 (8)***], que houve um aumento desta percentagem. A Figura 08C mostra o tempo de permanência nos braços abertos (TPBA), em ambas as doses utilizadas, 25mg/kg [38,00±7,65 (8)***] e 50mg/kg [50,67±5,12(8)*], houve redução do tempo em relação ao controle [74,71±5,19,00(8)] e o diazepam [160,10±5,81 (8)***] um aumento. Tem-se na figura 08D, a percentagem do tempo de permanência nos braços abertos (PTBA), após 08 dias de administração de *Hoodia gordonii*, onde observou-se que nas doses de 25mg/kg [16,67±3,71 (8)*] e 50mg/kg [21,20±1,59 (8)*] houve redução deste parâmetro, quando comparados ao controle [32,00±3,95(8)] e ocorreu um aumento com o diazepam [58,88±2,96 (8)***].

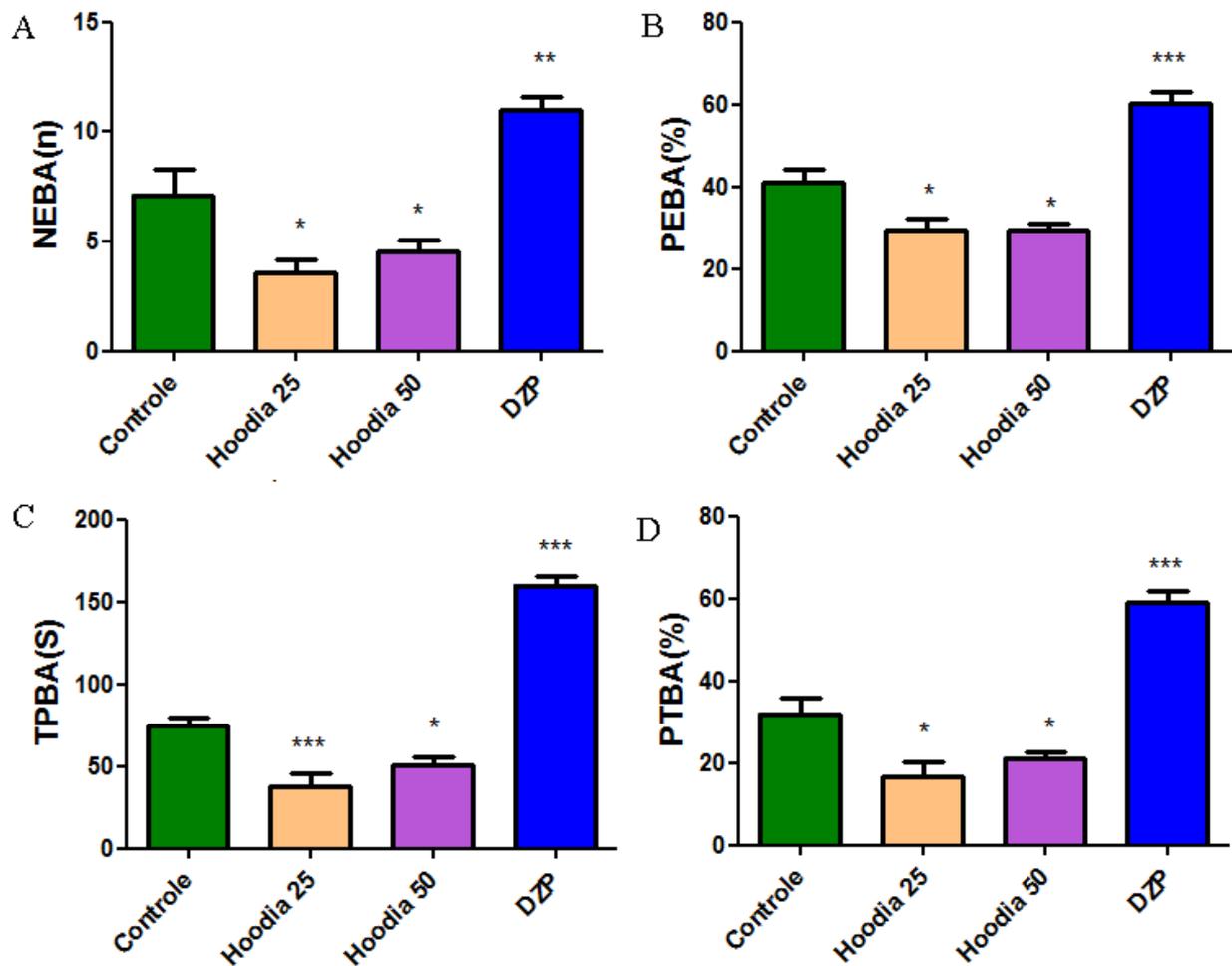


FIGURA 08- Efeito de *Hoodia gordonii* e diazepam (DZP) administrado via oral por 08 dias sobre o número de entrada nos braços abertos (NEBA-A), sobre a percentagem de entrada nos braços abertos (PEBA-B), sobre o tempo de permanência nos braços abertos (TPBA-C) e sobre a percentagem do tempo nos braços abertos (PTBA-D) no teste do labirinto em cruz elevado para camundongos. Controle (veículo), *Hoodia gordonii* (25 e 50 mg/kg, v.o.) e diazepam (2mg/kg, i.p.) foram administrados por 8 dias consecutivos e 30 ou 60 min antes do experimento. Os valores da figura representam a média \pm EPM. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguido por Student Newman Keuls como teste *post hoc*. Valores significativos: * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ versus controle.

A Figura 09A demonstra o número de entradas nos braços abertos (NEBA) após tratamento com *Hoodia gordonii*, por 15 dias consecutivos. Percebe-se uma redução do NEBA nas doses de 25 mg/kg [$5,16 \pm 0,65$ (8)*] e 50mg/kg [$5,66 \pm 0,21$ (8)*], quando comparados ao grupo controle [$7,62 \pm 0,75$ (8)] e um aumento na dose do diazepam [$10,63 \pm 0,56$ (8)***]. Ainda na Figura 09B, a percentagem de entrada nos braços abertos

(PEBA), nas doses de 25 mg/kg [32,60±2,90 (8)**] e 50 mg/kg [35,00±1,77 (8)*], tiveram seus valores reduzidos em relação ao grupo controle [44,29±2,38 (8)] e o diazepam [61,13±3,07 (8)***] promoveu um aumento deste parâmetro. Na Figura 09C, encontra-se o tempo de permanência nos braços abertos (TPBA), em que as doses, de 25mg/kg [47,33±4,53(8)***] e 50mg/kg [75,00±1,61(8)***] reduziram este parâmetro em relação ao controle [106,90±2,84(8)], efeito oposto foi verificado com diazepam [160,10±5,64 (8)***]. A Figura 09D mostra a percentagem de tempo de permanência nos braços abertos (PTBA), nas doses de 25mg/kg [16,29±1,55 (9)***] e 50 mg/kg [27,00±1,25 (9)***], e foi constatado uma redução deste parâmetro em relação ao controle [37,43±1,68 (9)], já o diazepam [58,25±3,12(8)***] promoveu um aumento.

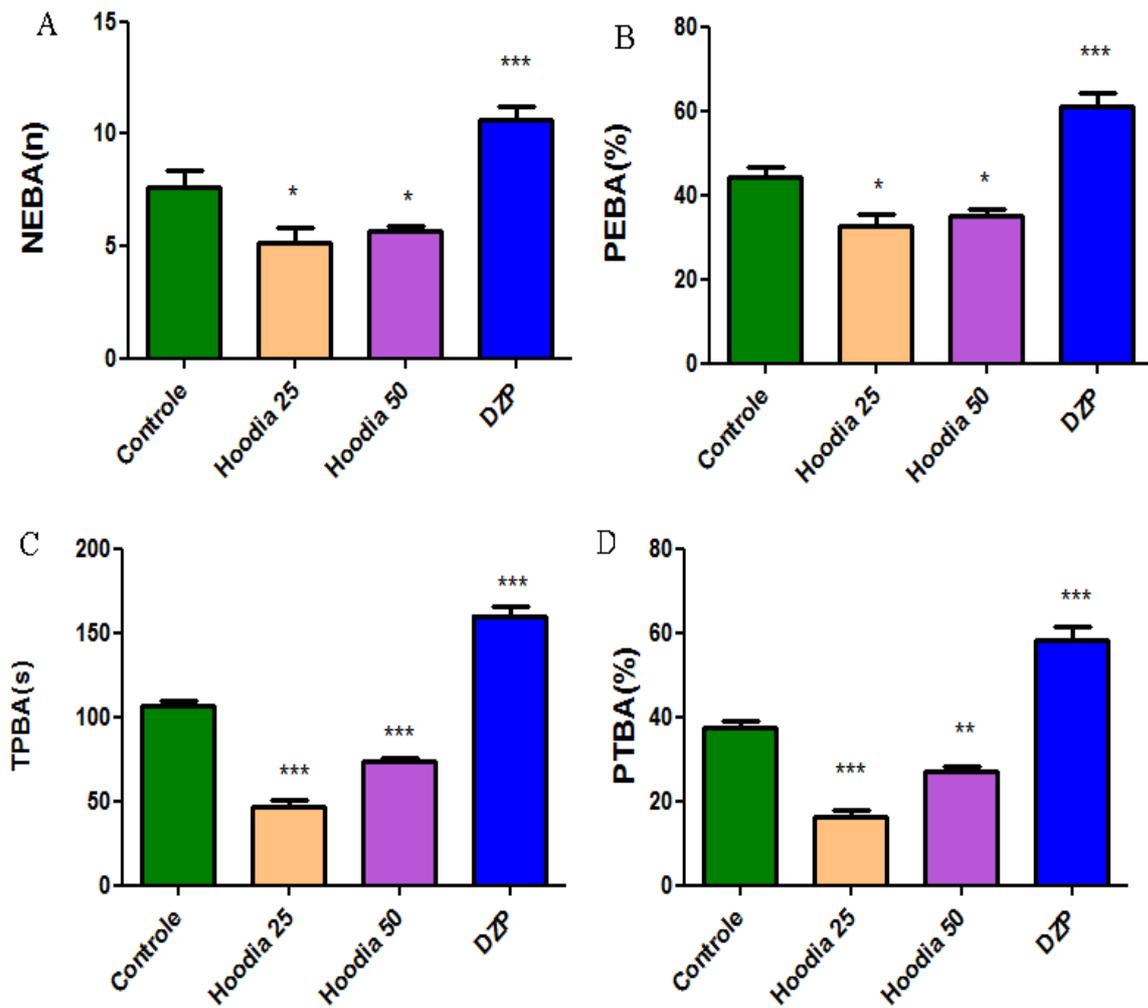


FIGURA 09- Efeito de *Hoodia gordonii* e diazepam (DZP) administrado via oral, por 15 dias, sobre o número de entrada nos braços abertos (NEBA-A), sobre a percentagem de entrada nos braços abertos (PEBA-B), sobre o tempo de permanência nos braços abertos (TPBA-C), e sobre a percentagem de tempo nos braços abertos (PTBA-D), no teste do labirinto em cruz elevado para camundongos. Controle (veículo), *Hoodia gordonii* (25 e 50 mg/kg, v.o.) ou diazepam (2mg/kg, i.p.) foram administrados por 15 dias consecutivos e 30 ou 60 min antes do experimento. Os valores da figura representam a média \pm EPM. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguido por Student Newman Keuls como teste *post hoc*. Valores significativos: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ versus controle.

5.3.2 Teste do Campo aberto

Após a realização do teste do labirinto em cruz elevado os mesmos animais foram submetidos ao teste do campo aberto, no qual foram analisados os parâmetros de atividade locomotora (ALE), *rearing* e *grooming*. A administração aguda (1 dose) de *Hoodia gordonii*, via oral, não causou alteração da atividade locomotora em nenhuma dose [25mg/kg:

62,86±3,77 (8); e 50mg/kg: 73,00±4,53 (8)], em comparação ao controle: [61,00±2,64 (8)] e o diazepam foi usado como padrão positivo [10,29±2,63 (8)***] (Figura 10). Não houve nenhuma alteração no número de *rearing* em ambas as doses administradas [25mg/kg: 11,67±0,91 (8); e 50mg/kg: 12,43±1,37 (8)], em comparação ao controle [15,29±1,16 (8)] e o diazepam [1,50±0,65 (8)***] (Figura 10B). Em relação ao número de *grooming*, houve uma redução na dose de 25mg/kg [1,33±0,21 (8)*], em comparação ao controle [2,66±0,33 (8)], o que não foi verificado na dose de 50mg/kg [2,00±0,30 (8)], diazepam reduziu este parâmetro [0,37±0,18 (8)***] (Figura 10A).

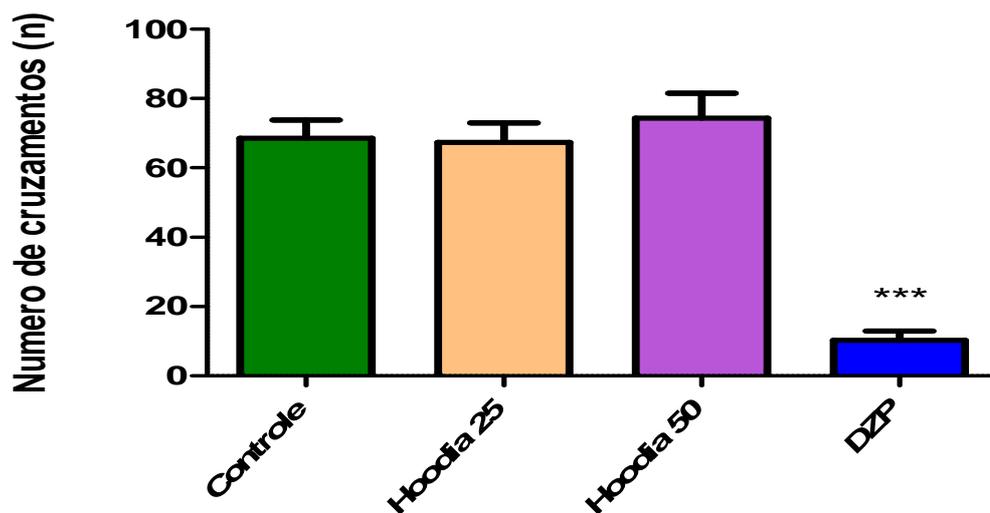


FIGURA 10 - Efeito de *Hoodia gordonii* e diazepam (DZP) administrado via oral por 1 dia, sobre a atividade locomotora espontânea (ALE) no teste do campo aberto para camundongos. Controle (veículo), *Hoodia gordonii* (25 e 50 mg/kg, v.o.) ou diazepam (2mg/kg, i.p.) foram administrados 30 ou 60 min antes do experimento. Os valores da figura apresentam a média ± EPM do número de travessias durante 5 minutos. Para análise estatística foi utilizado ANOVA, seguido de Students Newman Keuls como teste *post hoc*. Valores significativos: * $p < 0,05$ versus controle.

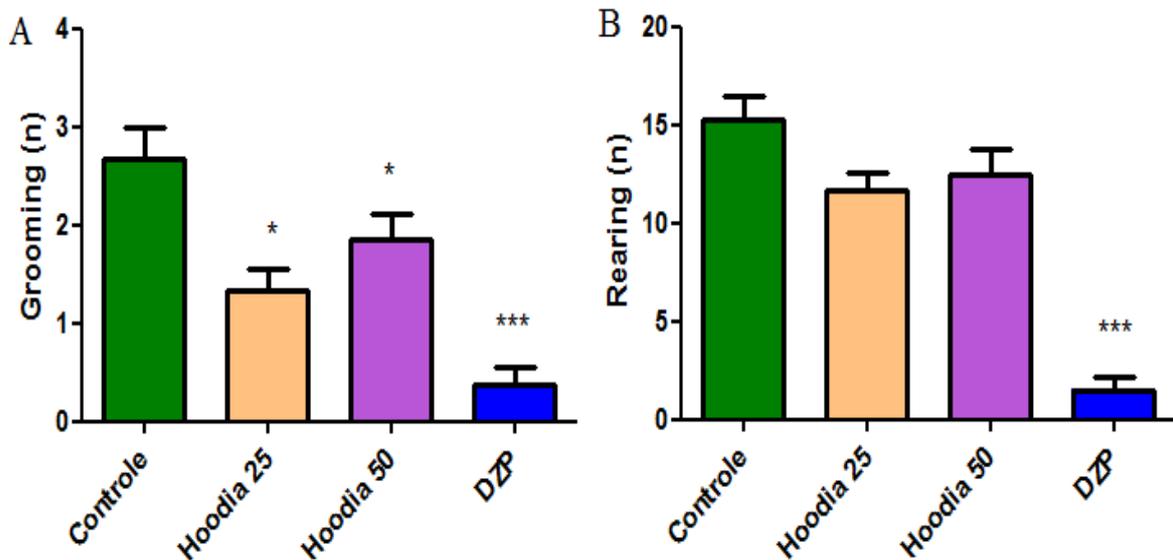


FIGURA 10A e 10B - Efeito de *Hoodia gordonii* e diazepam (DZP) administrado via oral por 1 dia, sobre o número de *grooming* e *rearing* no teste do campo aberto para camundongos. Controle (veículo), *Hoodia gordonii* (25 e 50 mg/kg, v.o.), ou diazepam (2mg/kg, i.p.) foram administrados 30 ou 60 min antes do experimento. Os valores da figura apresentam a média \pm EPM do número de *rearing* durante 5 minutos. Para análise estatística foi utilizado ANOVA, seguido de Students Newman Keuls como teste *post hoc*. Valores significativos: * $p < 0,05$; *** $p < 0,01$ versus controle.

Hoodia gordonii foi administrada por 08 dias, via oral e não foi verificada nenhuma modificação na atividade locomotora do animal, em ambas as doses utilizadas [25mg/kg: $30,67 \pm 3,31$ (8) e 50mg/kg: $26,57 \pm 1,06$ (8)], comparando com o controle [$29,43 \pm 2,18$ (8)], diazepam [$9,87 \pm 2,31$ (8)***] reduziu a locomoção (Figura 11). Assim, também se verificou que, o número de *rearing* em ambas as doses administradas [25mg/kg: $20,83 \pm 1,62$ (8); e 50mg/kg: $16,17 \pm 1,40$ (8)] não foi alterado em comparação ao controle [$17,71 \pm 1,40$ (8)], e diazepam [$1,50 \pm 0,59$ (8)***], droga padrão reduziu o *rearing* (Figura 11B). No número de *grooming*, houve uma redução nas doses de 25mg/kg [$2,00 \pm 0,30$ (8)*] e 50mg/kg [$0,87 \pm 0,12$ (8)***], em relação ao controle [$3,42 \pm 0,52$ (8)], assim como o diazepam [$0,37 \pm 0,18$ (8)***] (Figura 11A).

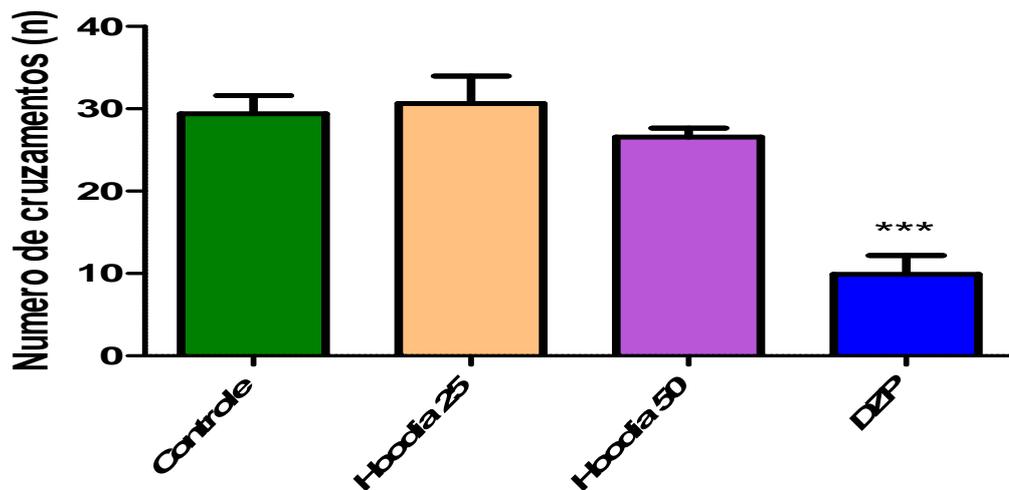


FIGURA 11 - Efeito de *Hoodia gordonii* e diazepam (DZP) administrado via oral, por 8 dias, sobre a atividade locomotora espontânea (ALE) no teste do campo aberto para camundongos. Controle (veículo) e *Hoodia gordonii* (25 e 50 mg/kg, v.o.), ou diazepam (2mg/kg, i.p.) foram administrados por 8 dias e 30, ou 60 min antes do experimento. Os valores da figura apresentam a média \pm EPM do número de travessias durante 5 minutos. Para análise estatística foi utilizado ANOVA, seguido de Students Newman Keuls como teste post hoc. Valores significativos: *** $p < 0,01$ versus controle.

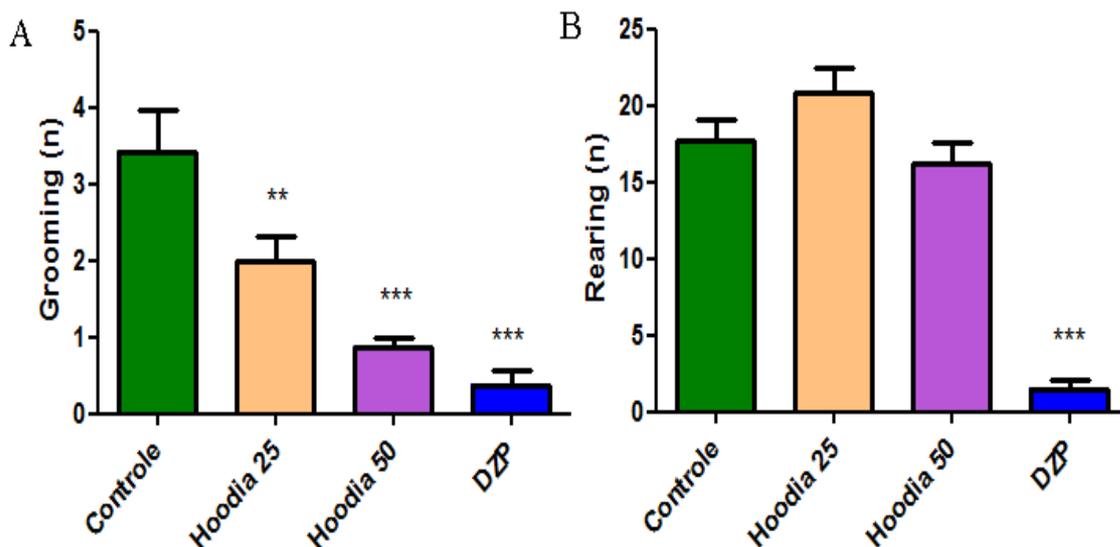


FIGURA 11A e 11B - Efeito de *Hoodia gordonii* e diazepam (DZP) administrado via oral, por 8 dias, sobre o número de grooming e rearing no teste do campo aberto para camundongos. Controle (veículo) e *Hoodia gordonii* (25 e 50 mg/kg, v.o.), ou diazepam (2mg/kg, i.p.) foram administrados por 8 dias e 30, ou 60 min antes do experimento. Os valores da figura apresentam a média \pm EPM. Para análise estatística foi utilizado o ANOVA, seguido de Students Newman Keuls como teste post hoc. Valores significativos: ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ versus controle.

No 15º dia de administração de *Hoodia gordonii*, por via oral, houve uma redução da atividade locomotora em ambas as doses [25mg/kg: $19,83 \pm 1,40$ (8)***] e 50mg/kg [$23,25 \pm 1,63$ (8)**] comparando com o controle [$32,43 \pm 1,73$ (8)] e o diazepam [$9,37 \pm 2,45$ (8)***] (Figura 12). O número de *rearing* foi reduzido na dose de 25mg/kg [$15,43 \pm 1,19$ (8)] em comparação ao controle [$24,63 \pm 1,56$ (8)**] e com a dose de 50mg/kg [$20,17 \pm 1,99$ (8)] não foi observada nenhuma alteração (Figura 12B) e o diazepam [$1,62 \pm 0,62$ (8)***] reduziu o *rearing* . Quanto ao número de *grooming*, houve uma redução nas doses de 25mg/kg: [$0,87 \pm 0,12$ (8)***] e 50mg/kg: [$1,12 \pm 0,12$ (8)**], quando comparado ao controle [$1,87 \pm 0,22$ (8)] (Figura 12A) e após administração do diazepam [$0,62 \pm 0,18$ (8)***] também ocorreu uma diminuição.

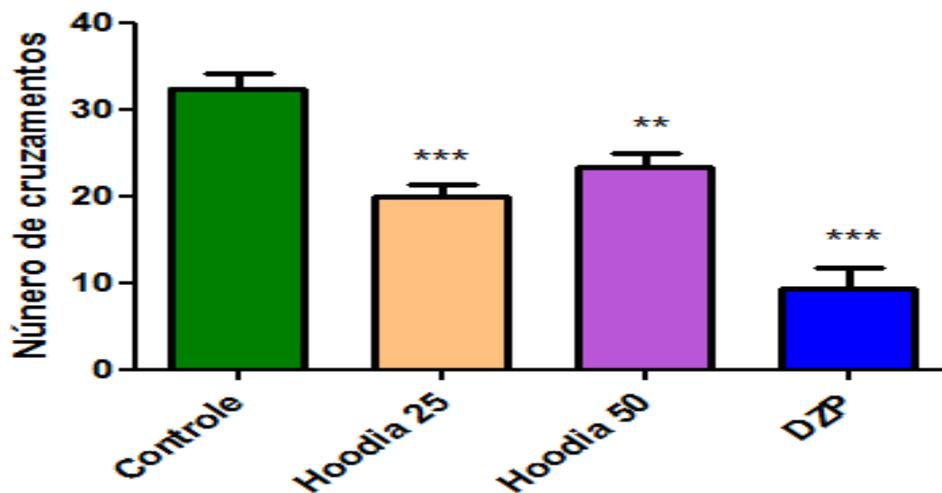


FIGURA 12 - Efeito de *Hoodia gordonii* e diazepam (DZP) administrado via oral por 15 dias, sobre a atividade locomotora espontânea (ALE) no teste do campo aberto para camundongos. Controle (veículo) e *Hoodia gordonii* (25 e 50 mg/kg, v.o.), ou diazepam (2mg/kg, i.p.) foram administrados por 15 dias e 30, ou 60 min antes do experimento. Os valores da figura apresentam a média ± EPM do número de travessias durante 5 minutos. Para análise estatística foi utilizado ANOVA, seguido de Students Newman Keuls como teste *post hoc*. Valores significativos: **p<0,01; ***p<0,001 *versus* controle.

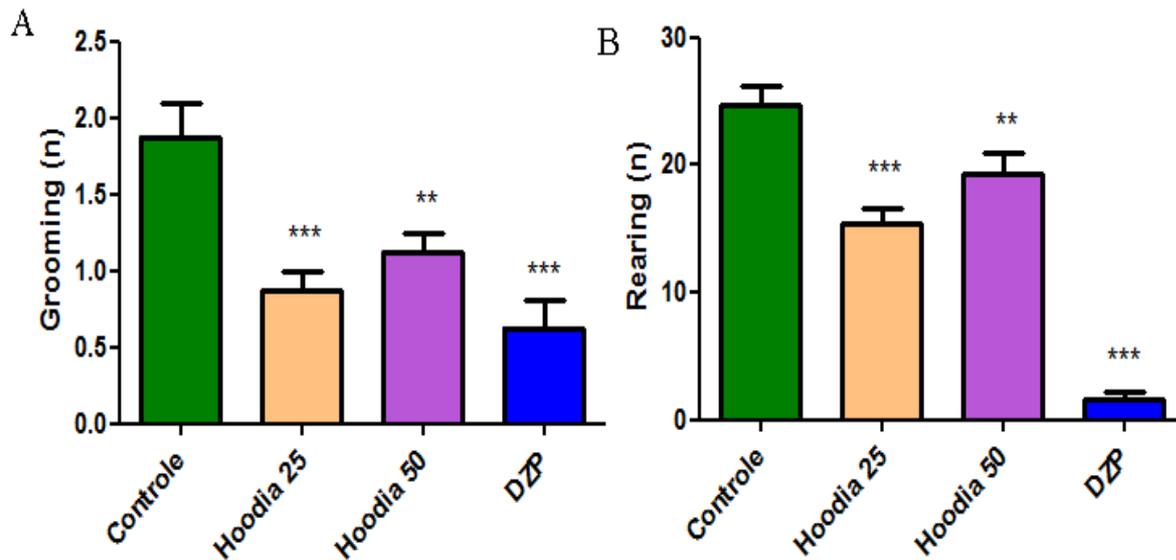


FIGURA 12A e 12B - Efeito de *Hoodia gordonii* e diazepam (DZP) administrado por via oral por 15 dias, sobre o número de *grooming* e *rearing* no teste do campo aberto para camundongos. Controle (veículo), *Hoodia gordonii* (25 e 50 mg/kg, v.o.), ou diazepam (2mg/kg, i.p.) foram administrados por 15 dias e 30, ou 60 min antes do experimento. Os valores da figura apresentam a média \pm EPM. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguido de Students Newman Keuls como teste *post hoc*. Valores significativos: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ versus controle.

5.3.3 Teste do Nado forçado

Para avaliar o potencial antidepressivo-símile foi realizado o teste do nado forçado, no qual os animais tratados com *Hoodia gordonii*, por 1 dia, apresentaram uma redução no tempo de imobilidade na dose de 25 mg/kg [38,00 \pm 3,53 (8)**] e 50mg/kg [42,13 \pm 4,24 (8)**], em comparação ao grupo controle [91,63 \pm 15,44 (8)] (Figura 13). No oitavo dia consecutivo de administração, também observou-se uma redução no tempo de imobilidade na dose de 25 mg/kg [30,83 \pm 5,04 (8)**] e 50mg/kg [42,33 \pm 6,11 (8)**] comparando com o controle [88,33 \pm 13,39 (8)] (figura 14). No 15° dia de administração verificou-se ainda uma redução na imobilidade, nas doses de 25mg/kg [38,67 \pm 7,49 (8)**] e 50mg/kg [30,14 \pm 4,81 (8)**], comparando com o grupo controle [65,86 \pm 4,69 (8)] (Figura 15).

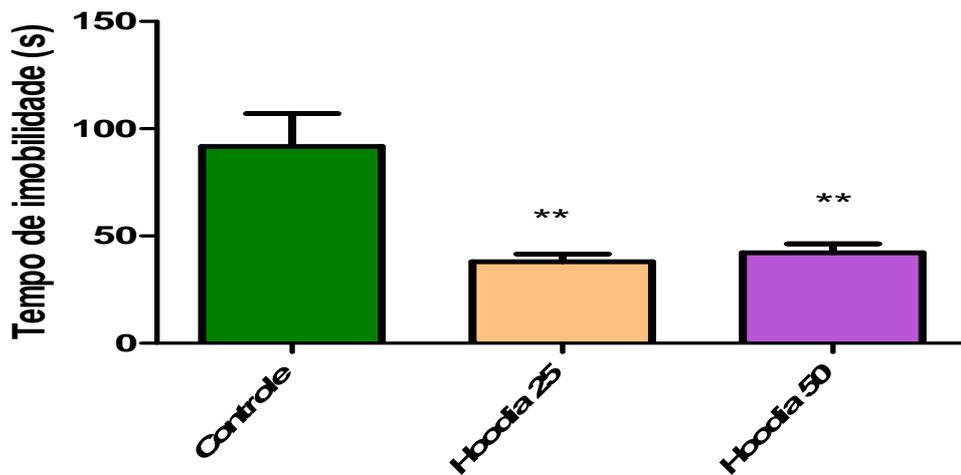


FIGURA 13 – Efeito agudo de *Hoodia gordonii* administrado via oral, sobre o tempo de imobilidade, em segundos, no teste do nado forçado em camundongos. Controle (veículo), *Hoodia gordonii* 25 e 50 mg/kg foram administrados uma vez e 60 min (v.o.) antes do experimento. Os valores da figura representam a média ± EPM do tempo de imobilidade (s) durante 5 minutos. Para análise estatística foi utilizado ANOVA, seguido por Student Newman Keuls como test *post hoc*. ** $p < 0,01$ versus controle.

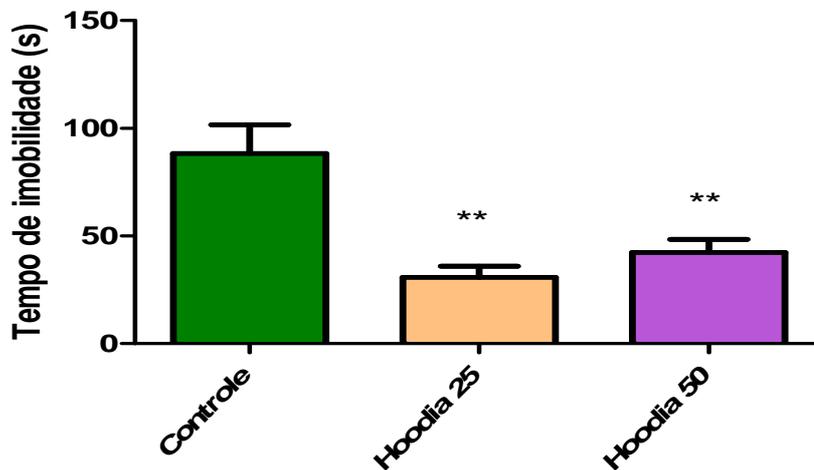


FIGURA 14 – Efeito de *Hoodia gordonii* administrado via oral durante 8 dias, sobre o tempo de imobilidade, em segundos, no teste do nado forçado em camundongos. Controle (veículo), *Hoodia gordonii* 25 e 50 mg/kg foram administrados por 8 dias consecutivos e 60 min (v.o.) antes do experimento. Os valores da figura representam a média ± EPM do tempo de imobilidade (s) durante 5 minutos. Para análise estatística foi utilizado ANOVA, seguido por Student Newman Keuls como teste *post hoc*. Valores significativos: ** $p < 0,01$ versus controle.

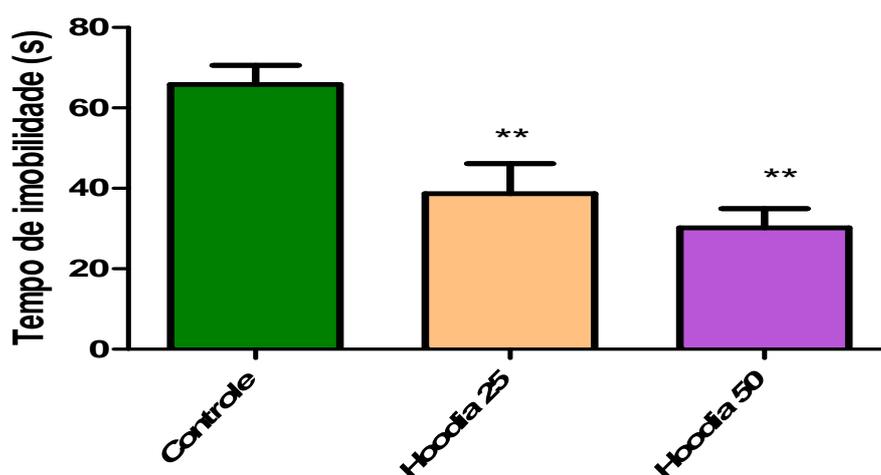


FIGURA 15 – Efeito de *Hoodia gordonii* administrado via oral, durante 15 dias, sobre o tempo de imobilidade, em segundos, no teste do nado forçado em camundongos. Controle (veículo), *Hoodia gordonii* 25 e 50 mg/kg foram administrados por 15 dias consecutivos e 60 min (v.o.) antes do experimento. Os valores da figura representam a média \pm EPM do tempo de imobilidade (s) durante 5 minutos. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguido por Student Newman Keuls como teste *post hoc*. Valores significativos: ** $p < 0,01$ versus controle.

5.4 Investigação do mecanismo antidepressivo-símile de *Hoodia gordonii*: Envolvimento dos sistemas monoaminérgicos

5.4.1 Sistema dopaminérgico

A Figura 16 revela que o pré-tratamento de camundongos com SCH 23390, antagonista dos receptores D_1 -símile, foi capaz de reverter a redução do tempo de imobilidade, observada com *Hoodia gordonii* administrada sozinha. A bupropiona, inibidor de recaptação de dopamina, reduziu o tempo de imobilidade e, quando previamente associada com antagonista D_1 , também houve reversão de seu efeito antidepressivo [Controle: $91,36 \pm 15,44(10)$; *Hoodia* 50: $42,13 \pm 4,24^*(8)$; SCH: $69,06 \pm 12,35(8)$; SCH+*Hoodia*: $79,25 \pm 9,77^a(8)$; Bup: $53,00 \pm 9,25^*(8)$; Bup+SCH: $101,00 \pm 5,22^b(8)$]. A Figura 17 mostra o efeito com antagonista dopaminérgico D_2 . O resultado indica que Sulpirida também reverteu o efeito antidepressivo de *Hoodia gordonii* e bupropiona [Controle: $91,36 \pm 15,44(8)$; *Hoodia*

50: $42,13 \pm 4,24^*$ (8); Sulpirida: $69,86 \pm 12,80^*$ (8); Sulp+*Hoodia*: $78,50 \pm 6,83^a$ (8); Bup: $53,00 \pm 9,25^*$ (8); Bup+Sulp: $102,40 \pm 5,13^b$ (8)].

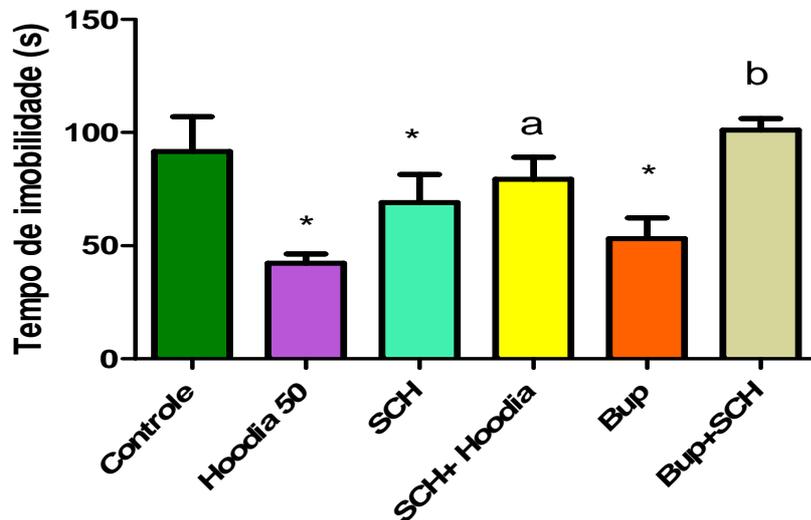


FIGURA 16 - Efeito de *Hoodia gordonii* (50 mg/kg) e bupropiona (30 mg/kg), via oral, sozinha ou associada com SCH23390 (0,5mg/kg), sobre o tempo de imobilidade (s) no teste do nado forçado em camundongos. Controle (veículo), *Hoodia gordonii* (*Hoodia* 50: 50 mg/kg) e bupropiona (BUP; 30 mg/kg), quando sozinhos, foram administrados 60 min antes do experimento; ou quando associados, foram administrados 30 min após a administração de SCH23390 (SCH: 0,5 mg/kg) e, então, 60 min depois foram submetidos ao experimento. Os valores da figura representam a média \pm EPM do tempo de imobilidade (s) durante 5 minutos. Para análise estatística foi utilizado ANOVA, seguido por Student Newman Keuls como teste *post hoc*. Valores significativos: * $p < 0,05$ versus controle; ^a $p < 0,05$ versus *Hoodia gordonii*, ^b $p < 0,05$ versus Bupropiona.

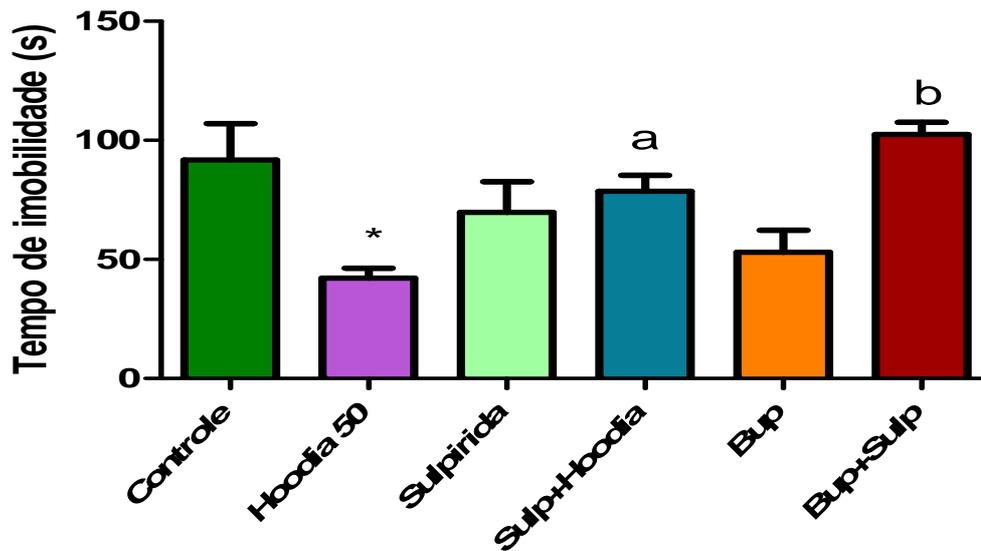


FIGURA 17 - Efeito da *Hoodia gordonii* (50 mg/kg) e bupropiona (30 mg/kg), via oral, sozinhos ou associados com sulpirida (50 mg/kg), sobre o tempo de imobilidade (s) no teste do nado forçado em camundongos. Controle (veículo), *Hoodia gordonii* (Hoodia 50: 50 mg/kg) e bupropiona (BUP; 30 mg/kg), quando sozinhos, foram administrados 60 min antes do experimento; ou quando associados, foram administrados 30 min após a administração de sulpirida (SPD; 50 mg/kg) e, então, 60 min depois foram submetidos ao experimento. Os valores da figura representam a média ± EPM do tempo de imobilidade (s) durante 5 minutos. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguido por Student Newman Keuls como teste *post hoc*. Valores significativos: * $p < 0,05$ versus controle; ^a $p < 0,001$ versus *Hoodia gordonii*; ^b $p < 0,05$ versus Bupropiona.

5.4.2 Sistema Noradrenérgico

O envolvimento com o sistema noradrenérgico foi observado na Figura 18. Foi visto que ambos os antagonistas noradrenérgicos α_1 (prazosina) e α_2 (ioimbina), quando administrados previamente a *H. gordonii*, reverteram a redução do tempo de imobilidade observada nos animais tratados posteriormente com *H. gordonii*, mostrando um envolvimento do sistema noradrenérgico no efeito antidepressivo do extrato [Controle: $87,75 \pm 12,83$ (8); *Hoodia* 50: $46,00 \pm 11,48^*$ (8); PZS: $111,7 \pm 6,85$ (8); *Hoodia*+PZS: $83,89 \pm 9,31^a$ (8); IOIM: $109,80 \pm 4,32$ (8); *Hoodia*+IOIM: $70,89 \pm 6,00^a$ (8)].

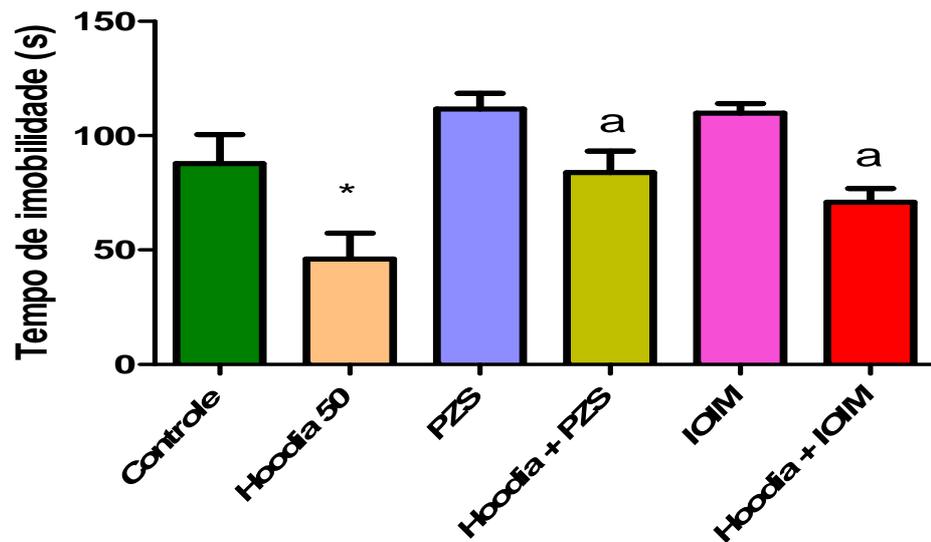


FIGURA 18 - Efeito de *Hoodia gordonii* (50 mg/kg), via oral, sozinha ou associada com Prazosina (1mg/kg), e ioimbina (1 mg/kg), sobre o tempo de imobilidade (s) no teste do nado forçado em camundongos. Controle (veículo), *Hoodia gordonii* (*Hoodia* 50: 50 mg/kg) foram administrados 60 min antes do experimento; ou quando associados, foram administrados 30 min após a administração de Prazosina (PZS: 1 mg/kg) ou Ioimbina (IOIM: 1mg/kg) e, então, 60 min depois foram submetidos ao experimento. Os valores representam a média ± EPM do tempo de imobilidade (s) durante 5 minutos. Para análise estatística foi utilizado ANOVA, seguido por Student Newman Keuls como teste *post hoc*. Valores significativos: ^ap<0,05 *versus* controle; ^ap<0,05 *versus* *Hoodia gordonii*.

5.4.3. Sistema Serotonérgico

As Figuras 19, 20, 21 e 22 mostram o envolvimento de *Hoodia gordonii* com o sistema serotonérgico. Na Figura 19 foi observado que o PCPA, um inibidor da síntese de serotonina, bloqueou o efeito antidepressivo do extrato. A fluoxetina é um inibidor de recaptação de serotonina e também teve sua ação reduzida, em torno de 60%, quando administrada após o PCPA [Controle: 98,14±16,16 (9); *Hoodia* 50: 42,13±4,24* (8); PCPA: 136,30±6,48 (10); PCPA+*Hoodia*: 121,00±11,79^a (8); FLU: 54,26±9,10 (9); FLU+PCPA: 97,79±11,58 (9)]. A Figura 20 apresenta um antagonista serotonérgico 5HT_{1A}, NAN-190, que quando administrado previamente com *H. gordonii*, reverteu a redução do tempo de imobilidade do animal, observado com a *H. gordonii* sozinha. A fluoxetina também teve sua ação revertida pelo antagonista serotonérgico 5HT_{1A} (Controle: 138,20±8,81; *Hoodia* 50: 42,13±4,24; NAN-190: 51,75±13,03; NAN+*Hoodia*: 100,30±19,69; FLU: 43,02±3,77; FLU+NAN: 133,00±14,93).

A Figura 21 apresenta o envolvimento do extrato *H. gordonii* com o antagonista serotoninérgico 5HT_{2A/2C}, ritanserina. Foi identificada uma reversão do efeito antidepressivo dos camundongos. A fluoxetina alterou a resposta do antagonista, causando uma ação depressora no animal [(Controle: 91,63±15,44; Hoodia 50: 42,13±4,24; Ritanserina: 92,13±15,33; Ritan+Hoodia: 103,00±12,08; FLU: 43,02±3,77; FLU+Ritan:73,40±7,02)]. Na Figura 22 é possível identificar o potencial de interação do extrato *H. gordonii* com o receptor 5HT₃, uma vez que foi observada uma reversão do seu efeito antidepressor, quando os animais foram pré-tratados com antagonista para este receptor [(Controle: 91,00±15,44; Hoodia 50: 42,13±4,24; Ondan: 95,00±15,15; Ondan+Hoodia: 74,50±12,13; FLU: 43,02±3,77; FLU+Ondan:74,00±13,24)].

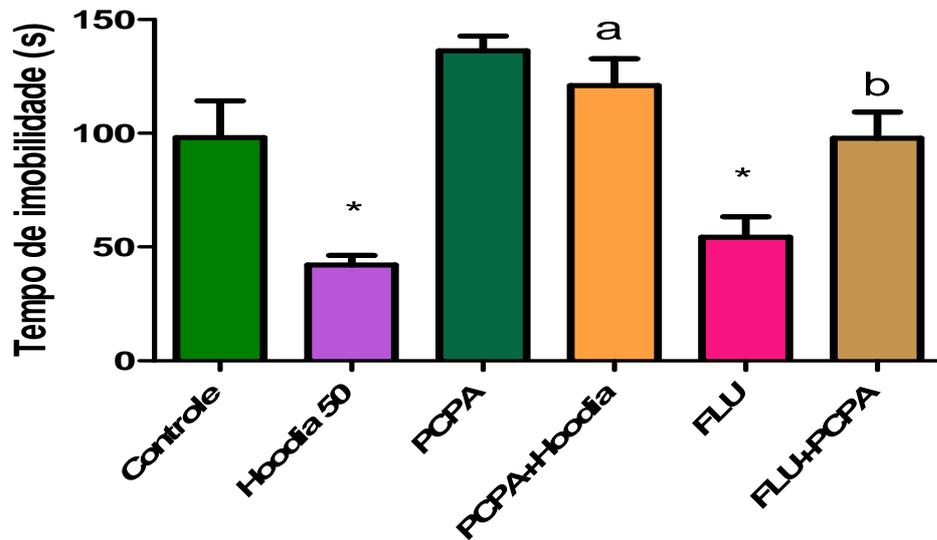


FIGURA 19 – Efeito de *Hoodia gordonii* (50mg/kg) e fluoxetina (35mg/kg), via oral, sozinhos ou associados com PCPA (100mg/kg), sobre o tempo de imobilidade no teste do nado forçado. Controle (veículo), *Hoodia gordonii* (Hoodia 50: 50mg/kg) e fluoxetina (FLU: 35mg/kg), quando sozinhos foram administrados 30 min após a última administração de PCPA (administrado por 4 dias – 100mg/kg) e 60 min depois foram submetidos ao experimento. Os valores correspondem a média±EPM do tempo de imobilidade durante 5 minutos. Para análise estatística foi utilizado ANOVA, seguido de Student Newman Keuls como teste *post hoc*. Valores significativos: * $p < 0,05$ versus controle; ^a $p < 0,05$ versus *Hoodia gordonii*; ^b $p < 0,05$ versus fluoxetina.

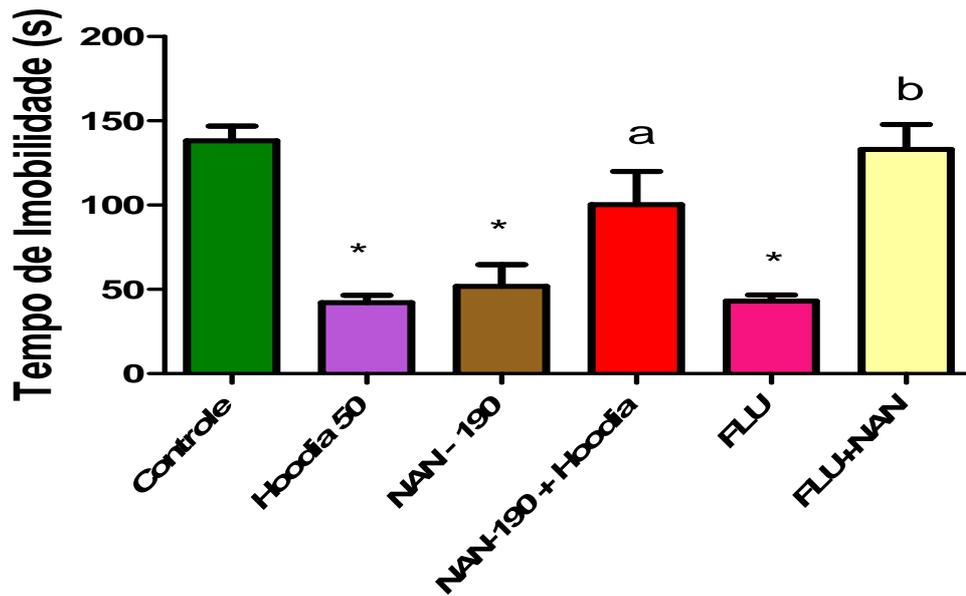


FIGURA 20 – Efeito de *Hoodia gordonii* (50mg/kg) e fluoxetina (35mg/kg) via oral, sozinhos ou associados com NAN (0,5mg/kg), sobre o tempo de imobilidade no teste do nado forçado. Controle (veículo), *Hoodia gordonii* (Hoodia 50: 50mg/kg) e fluoxetina (FLU: 35mg/kg), quando sozinhos foram administrados 30 min após a administração de NAN-190 (0,5mg/kg) e 60 min depois foram submetidos ao experimento. Os valores correspondem a média±EPM do tempo de imobilidade durante 5 minutos. Para análise estatística foi utilizado ANOVA, seguido de Student Newman Keuls como teste *post hoc*. Valores significativos: * $p < 0,05$ versus controle; ^a $p < 0,05$ versus *Hoodia gordonii*; ^b $p < 0,05$ versus fluoxetina.

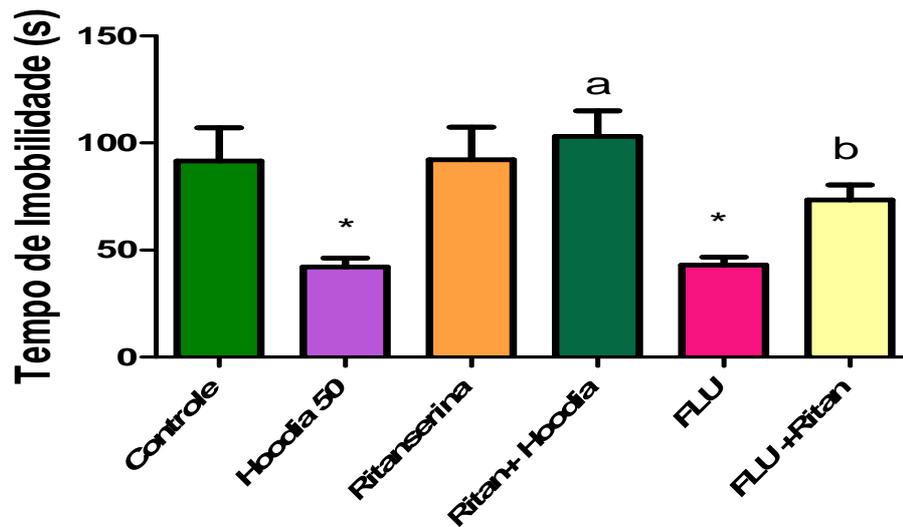


FIGURA 21 – Efeito de *Hoodia gordonii* (50mg/kg) e fluoxetina (35mg/kg) via oral, sozinhos ou associados com ritanserina (1mg/kg), sobre o tempo de imobilidade no teste do nado forçado. Controle (veículo), *Hoodia gordonii* (*Hoodia* 50: 50mg/kg) e fluoxetina (FLU: 35mg/kg), quando sozinhos foram administrados 30 min após a administração de ritanserina (1mg/kg) e 60 min depois foram submetidos ao experimento. Os valores correspondem a média±EPM do tempo de imobilidade durante 5 minutos. Para análise estatística foi utilizado ANOVA, seguido de Student Newman Keuls como teste post hoc. Valores significativos: * $p < 0,05$ versus controle; ^a $p < 0,05$ versus *Hoodia gordonii*; ^b $p < 0,05$ versus fluoxetina.

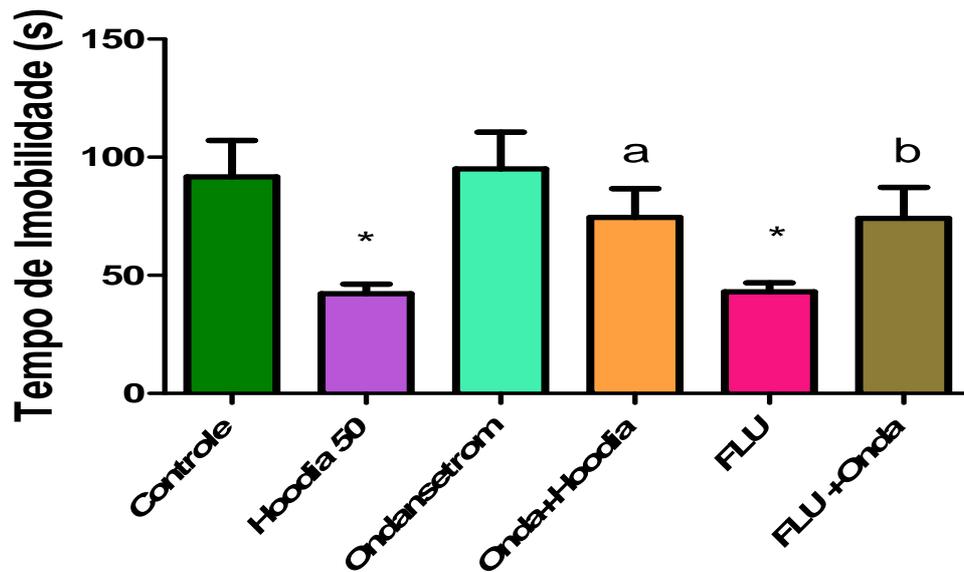


FIGURA 22 – Efeito de *Hoodia gordonii* (50mg/kg) e fluoxetina (35mg/kg) via oral, sozinhos ou associados com ondansetrom (1mg/kg), sobre o tempo de imobilidade no teste do nado forçado. Controle (veículo), *Hoodia gordonii* (Hoodia 50: 50mg/kg) e fluoxetina (FLU: 35mg/kg), quando sozinhos foram administrados 30 min após a administração de ondansetrom (1mg/kg) e 60 min depois foram submetidos ao experimento. Os valores correspondem a média±EPM do tempo de imobilidade durante 5 minutos. Para análise estatística foi utilizado ANOVA, seguido de Student Newman Keuls como teste *post hoc*. Valores significativos: * $p < 0,05$ versus controle; ^a $p < 0,05$ versus *Hoodia gordonii*; ^b $p < 0,05$ versus fluoxetina.

5.5 Avaliação dos efeitos de *Hoodia gordonii* sobre a concentração de noradrenalina, serotonina, dopamina e seus metabólitos por HPLC

A Figura 23 mostra a concentração de noradrenalina (NE) em corpo estriado de camundongos após tratamento com *Hoodia gordonii* por 1 dia, nas doses de 25 [4,46±0,43* (7)] e 50mg/kg [5,09.83±0,42* (7)], e houve um aumento na concentração de NE quando comparado ao controle (2,59±0,48).

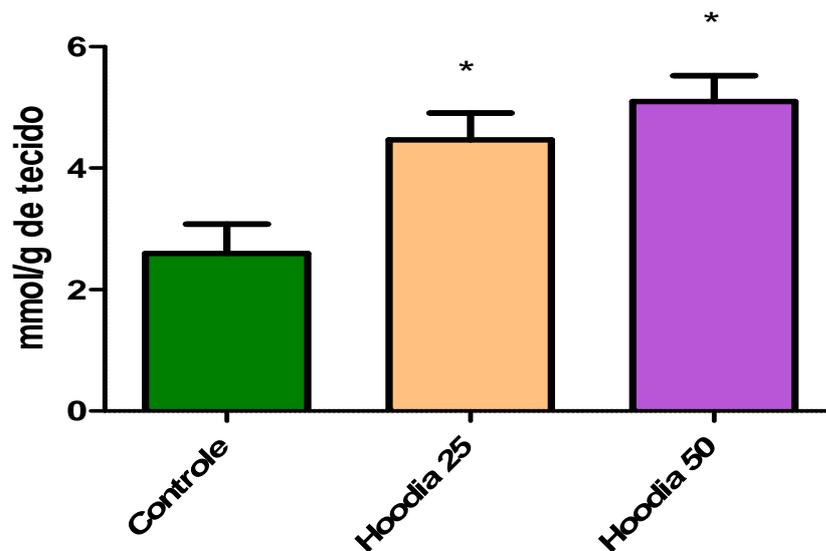


FIGURA 23 - Determinação da concentração de noradrenalina (NE) em corpo estriado de camundongos após tratamento de 1 dia com *Hoodia gordonii* (25 e 50mg/kg), via oral. Depois de 1 hora de tratamento, os animais foram sacrificados e dissecados para a retirada do corpo estriado. A determinação das monoaminas foi feita pela técnica de HPLC com detecção eletroquímica. Os resultados (mmol/g de tecido) são expressos como média \pm EPM. Para análise estatística foi utilizado ANOVA e teste Student Newman's Keul *post hoc*.

A Figura 24 apresenta a concentração de serotonina (5HT) e seu metabólito 5HIAA, em corpo estriado de camundongos após tratamento com *Hoodia gordonii*, por 1 dia, através da técnica do HPLC. Foi visto que ocorreu um aumento da concentração da monoamina nas doses de 25 [6,83 \pm 1,12 (7)*] e 50mg/kg [6,83 \pm 0,84(7)*] em relação ao controle [2,60 \pm 0,87(7)]. Por sua vez, a concentração do metabólito 5HIAA nas doses de 25 [5,07 \pm 1,37(7)] e 50mg/kg [3,62 \pm 0,91(7)] não foram diferentes do valor do grupo controle [3,26 \pm 0,91 (7)].

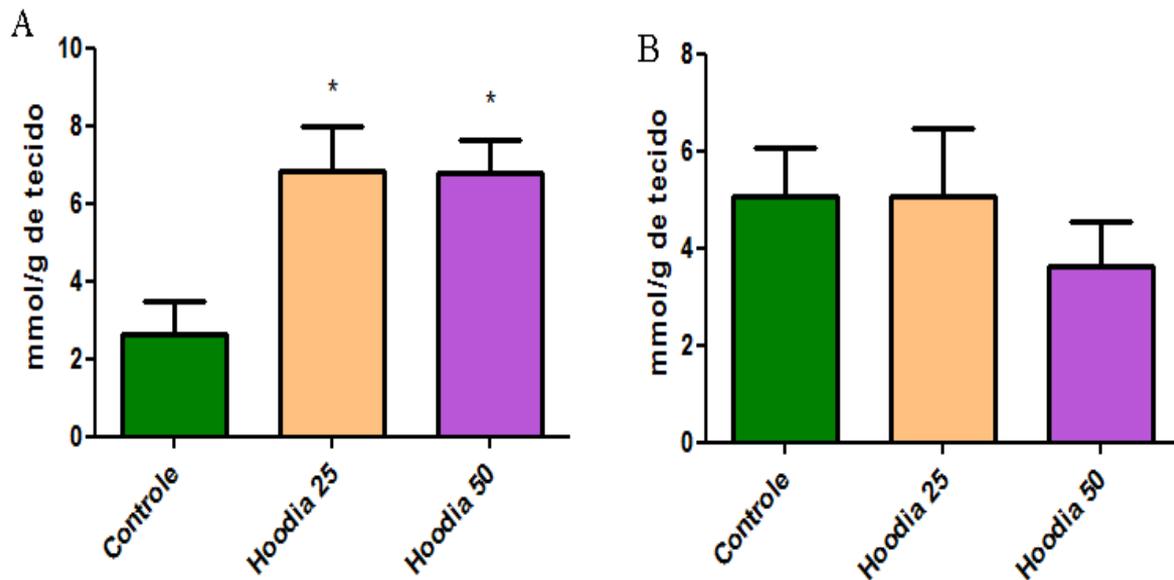


FIGURA 24- Determinação da concentração de serotonina (5HT-A) e seu metabólito o ácido 5-hidroxiindolacético (5HIAA-B), em corpo estriado de camundongos após tratamento de 1 dia com *Hoodia gordonii* (25 e 50mg/kg) via oral. Após 1 hora de tratamento, os animais foram sacrificados e dissecados para a retirada do corpo estriado. A determinação das monoaminas foi feita pela técnica de HPLC com detecção eletroquímica. Os resultados (mmol/g de tecido) são expressos como média \pm EPM. Para análise estatística foi utilizado ANOVA e teste Student Newman's Keul *post hoc*. Valores significativos $*p < 0,05$, quando comparados ao controle.

A figura 25 mostra a concentração de dopamina (DA), em corpo estriado de camundongos, após tratamento com *Hoodia gordonii*, por 1 dia, nas doses de 25 [4,27 \pm 0,99 (6)] e 50mg/kg [5,44 \pm 1,09 (6)] através da técnica do HPLC, não houve alteração em relação ao controle [5,21 \pm 0,77 (6)].

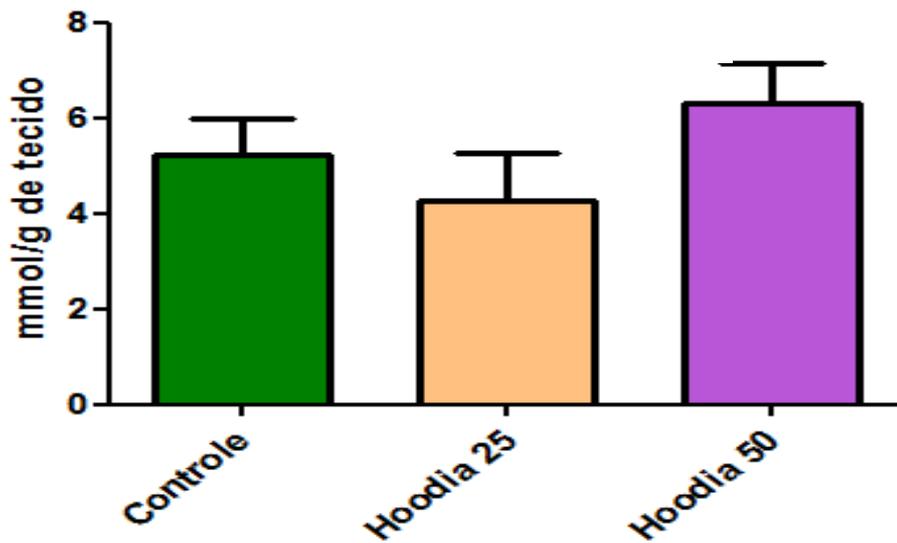


FIGURA 25- Determinação da concentração de dopamina (DA) em corpo estriado de camundongos, após tratamento de 1 dia com *Hoodia gordonii* (25 e 50mg/kg), via oral. Depois de 1 hora de tratamento, os animais foram sacrificados e dissecados para a retirada do corpo estriado. A determinação da concentração da monoamina foi feita pela técnica de HPLC com detecção eletroquímica. Os resultados (mmol/g de tecido) são expressos como média \pm EPM. Para análise estatística foi utilizado ANOVA e teste Student Newman's Keul *post hoc*.

A Figura 26 revela a concentração dos metabólitos de dopamina, o ácido dihidroxifenilacético (DOPAC), e ácido 4-hidroxi-3-metoxi-fenilacético (HVA) em corpo estriado de camundongos, após tratamento com *Hoodia gordonii*, por 01 dia, através da técnica do HPLC. Nenhuma alteração foi observada em ambas as doses de 25 [2,50 \pm 0,21 (7)] e 50mg/kg [3,17 \pm 0,34 (7)] em relação ao controle [3,76 \pm 0,90(7)] no DOPAC. Na concentração de HVA, na dose de 25 [3,69 \pm 0,65 (7)] não houve alteração significativa, entretanto, na dose de 50 [2,59 \pm 0,24 (7)*] houve uma redução na quantidade da monoamina em relação ao controle [5,53 \pm 1,08 (7)].

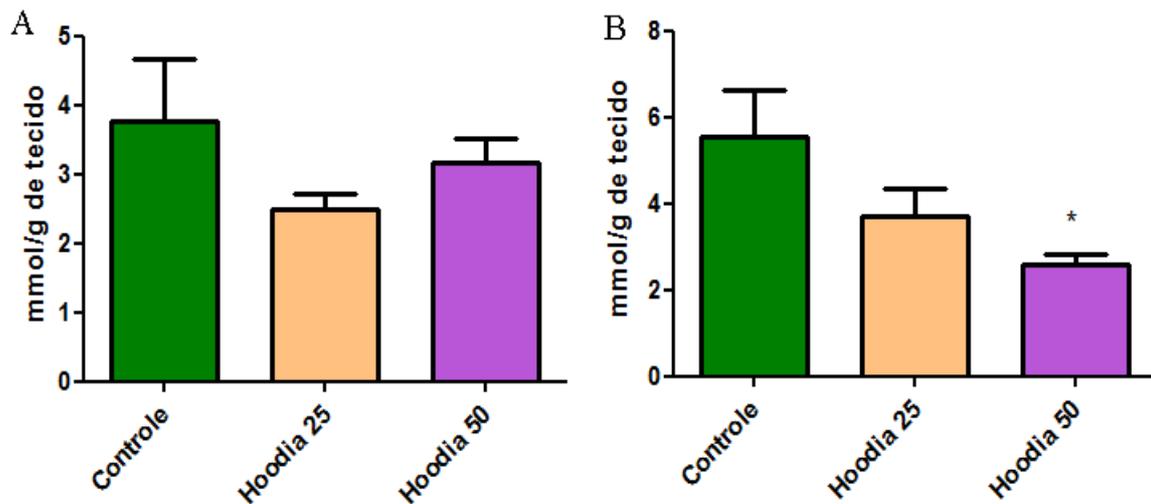


FIGURA 26 - Determinação da concentração de ácido dihidroxifenilacético (DOPAC) e ácido 4-hidroxi-3-metoxi-fenilacético (HVA), metabólitos da dopamina, em corpo estriado de camundongos após tratamento de 1 dia com *Hoodia gordonii* (25 e 50mg/kg) via oral. Após 1 hora de tratamento, os animais foram sacrificados e dissecados para a retirada do corpo estriado. A determinação das monoaminas foi feita pela técnica de HPLC com detecção eletroquímica. Os resultados (mmol/g de tecido) são expressos como média \pm EPM. Para análise estatística foi utilizado ANOVA e teste Student Newman-Keul *post hoc*. Valores significativos * $p < 0,05$, quando comparados ao controle.

A Figura 27 mostra a concentração de noradrenalina (NE), em corpo estriado de camundongos, após tratamento com *Hoodia gordonii* por 8 dias, observou-se um aumento significativo nas dose de 50mg/kg [$6,04 \pm 0,86$ (7)*] em relação ao controle [$3,45 \pm 0,81$ (7)]. Nenhuma alteração ocorreu na dose de 25 mg/kg [$2,09 \pm 0,35$ (7)].

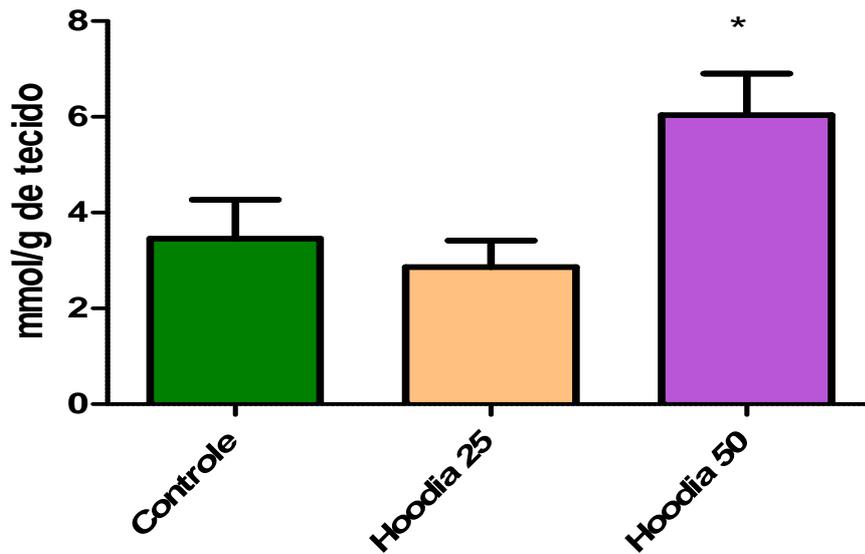


FIGURA 27 - Determinação da concentração de noradrenalina (NE) em corpo estriado de camundongos após tratamento de 8 dias com *Hoodia gordonii* (25 e 50mg/kg) via oral. Após 1 hora de tratamento, os animais foram sacrificados e dissecados para a retirada do corpo estriado. A determinação das monoaminas foi feita pela técnica de HPLC com detecção eletroquímica. Os resultados (nm/g de tecido) são expressos como média \pm EPM. Para análise estatística foi utilizado ANOVA e teste Student Newman's Keul *post hoc*. Valores significativos * $p < 0,05$, quando comparados ao controle.

A Figura 28 se refere à determinação da concentração de serotonina (5HT) e seu metabólito 5HIAA, em corpo estriado de camundongos, após tratamento com *Hoodia gordonii* por 08 dias através da técnica do HPLC. Pode-se ver que não ocorreu alteração significativa na concentração de 5HT após tratamento com *H. gordonii* nas doses de 25 [5,56 \pm 1,01 (7)] e 50mg/kg [5,72 \pm 0,80 (7)] em relação ao controle [4,45 \pm 1,02 (7)]. A concentração do metabólito 5HIAA, também não foi alterada nas doses de 25 [2,02 \pm 0,24 (7)] e 50 [1,93 \pm 0,36 (7)], quando comparado ao controle [2,92 \pm 0,52 (7)].

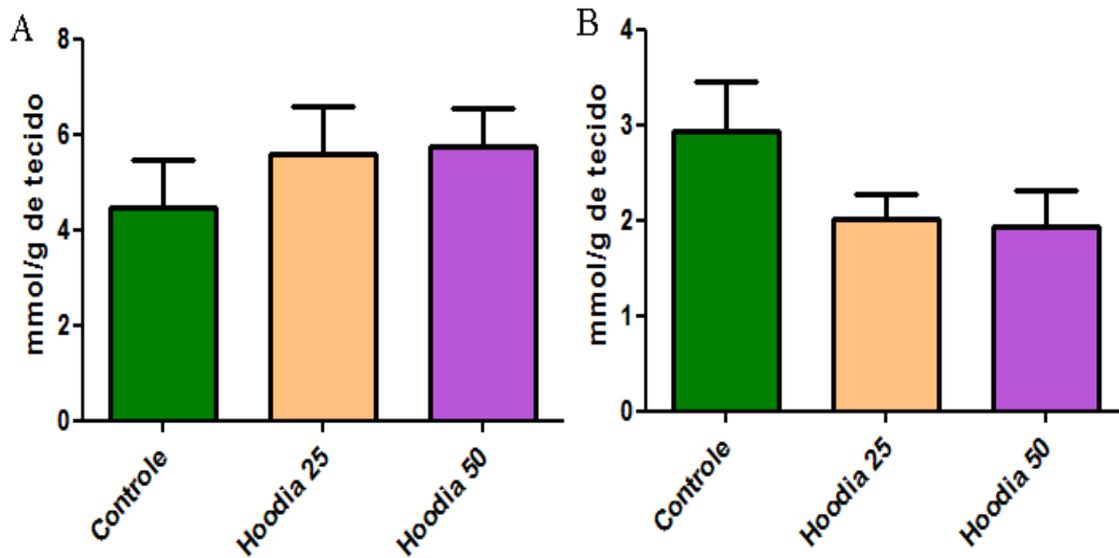


FIGURA 28- Determinação da concentração de serotonina (5HT-A) e seu metabólito o ácido 5-hidroxiindolacético (5HIAA-B), em corpo estriado de camundongos, após tratamento de 8 dias com *Hoodia gordonii* (25 e 50mg/kg), via oral. Após 1 hora de tratamento, os animais foram sacrificados e dissecados para a retirada do corpo estriado. A determinação das monoaminas foi feita pela técnica de HPLC com detecção eletroquímica. Os resultados (nm/g de tecido) são expressos como média \pm EPM. Para análise estatística foi utilizado ANOVA e teste Student Newman's Keul *post hoc*.

A Figura 29 mostra que não houve nenhuma alteração significativa na concentração de dopamina (DA), em corpo estriado de camundongos, após tratamento com *Hoodia gordonii*, por 8 dias, nas doses de 25 [3,60 \pm 0,65 (7)] e 50mg/kg [3,49 \pm 1,05 (7)] através da técnica do HPLC, quando comparado ao controle [3,75 \pm 0,59 (7)].

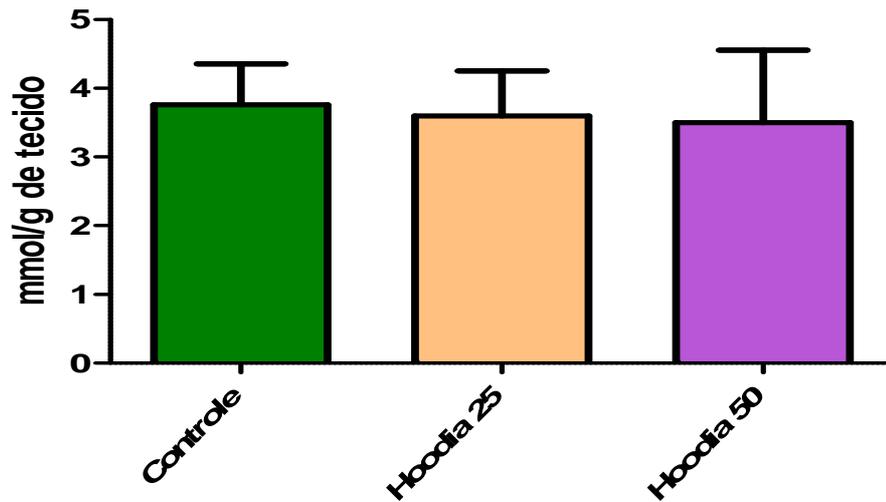


FIGURA 29- Determinação da concentração de dopamina (DA) em corpo estriado de camundongos após tratamento de 8 dias com *Hoodia gordonii* (25 e 50mg/kg) via oral. Após 1 hora de tratamento, os animais foram sacrificados e dissecados para a retirada do corpo estriado. A determinação das monoaminas foi feita pela técnica de HPLC com detecção eletroquímica. Os resultados (nm/g de tecido) são expressos como média \pm EPM. Para análise estatística foi utilizado ANOVA e teste Student Newman's Keul *post hoc*.

A Figura 30 representa a concentração dos metabólitos de dopamina, o ácido dihidroxifenilacético (DOPAC), e ácido 4-hidroxi-3-metoxi-fenilacético (HVA) em corpo estriado de camundongos, após tratamento com *Hoodia gordonii*, por 8 dias, através da técnica do HPLC. Não ocorreu alteração em ambas as doses de 25 [2,96 \pm 0,45 (7)] e 50mg/kg [3,67 \pm 0,50 (7)] na concentração de DOPAC, nem de HVA {dose de 25 [2,35 \pm 0,63 (7)] e de 50 [3,14 \pm 0,82 (7)]} e seus respectivos controles {controle DOPAC [3,50 \pm 0,74 (7)]; controle HVA [2,87 \pm 0,80 (7)]}.

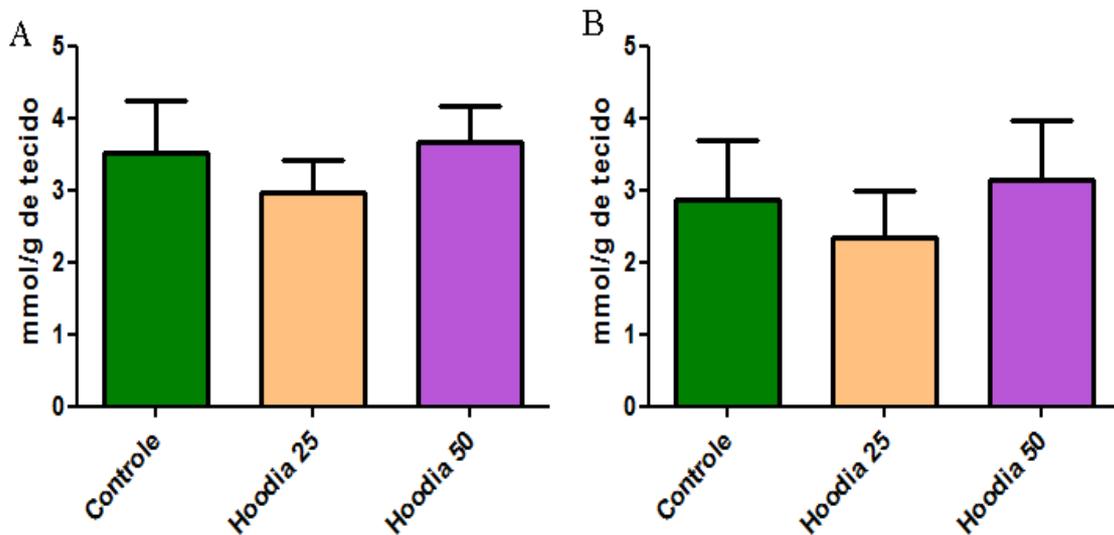


FIGURA 30- Determinação da concentração de ácido dihidroxifenilacético (DOPAC) e ácido 4-hidroxi-3-metoxi-fenilacético (HVA), metabólitos da dopamina em corpo estriado de camundongos após tratamento de 8 dias com *Hoodia gordonii* (25 e 50mg/kg) via oral. Depois de 1 hora de tratamento, os animais foram sacrificados e dissecados para a retirada do corpo estriado. A determinação da concentração de metabólitos foi feita pela técnica de HPLC com detecção eletroquímica. Os resultados (nm/g de tecido) são expressos como média \pm EPM. Para análise estatística foi utilizado ANOVA e teste Student Newman's Keul *post hoc*.

A Figura 31 mostra a concentração de noradrenalina (NE) em corpo estriado de camundongos após tratamento com *Hoodia gordonii*, por 15 dias, nas doses de 25 [3,62 \pm 1,45* (7)] e 50mg/kg [7,67 \pm 0,86** (7)] através da técnica do HPLC. Observa-se que ocorreu um aumento na dose de 50 em relação ao controle [2,80 \pm 1,10 (7)].

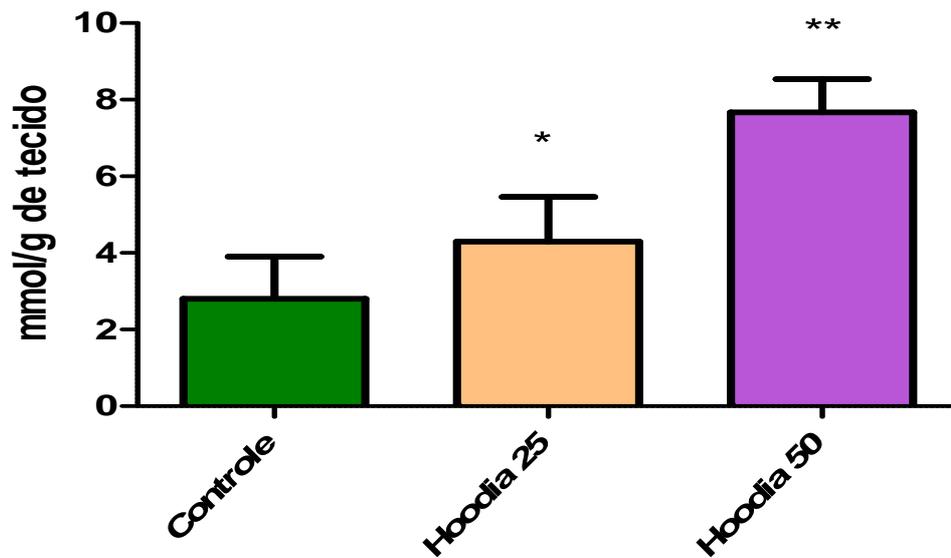


FIGURA 31- Determinação da concentração de noradrenalina (NE) em corpo estriado de camundongos após tratamento de 15 dias com *Hoodia gordonii* (25 e 50mg/kg) via oral. Depois de 1 hora de tratamento, os animais foram sacrificados e dissecados para a retirada do corpo estriado. A determinação das monoaminas foi feita pela técnica de HPLC com detecção eletroquímica. Os resultados (nm/g de tecido) são expressos como média \pm EPM. Para análise estatística foi utilizado ANOVA e teste Student Newman's Keul *post hoc*. Valores significativos * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, quando comparados ao controle.

A determinação da concentração de serotonina (5HT) e seu metabólito 5HIAA, em corpo estriado de camundongos após tratamento com *Hoodia gordonii* por 15 dias, através da técnica do HPLC é observada na Figura 32. Pode-se ver que ocorreu um aumento da serotonina nas doses de 25 [$5,17 \pm 1,00$ (7)*] e 50mg/kg [$4,43 \pm 0,89$ (7)*] em relação ao controle [$1,78 \pm 0,20$ (7)]. A concentração de ácido 5-hidroxiindolacético (5HIAA), um metabólito da serotonina, não foi alterada em ambas as doses de 25 [$3,58 \pm 1,15$ (7)] e 50mg/kg [$5,47 \pm 1,47$ (7)] em relação ao controle [$4,02 \pm 1,24$ (7)].

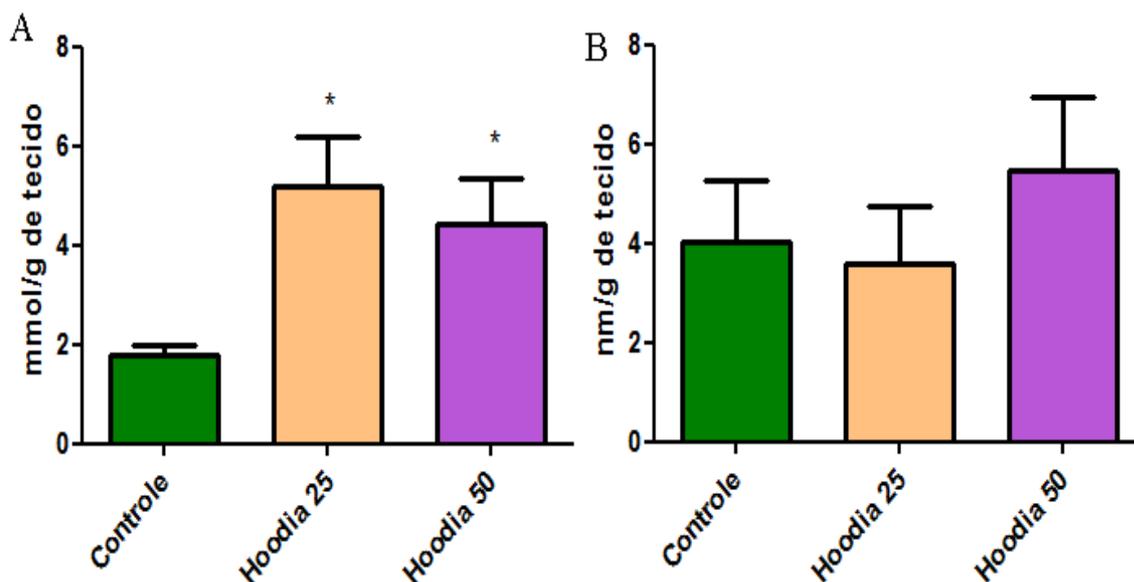


FIGURA 32- Determinação da concentração de serotonina (5HT) e seu metabólito ácido 5-hidroxiindolacético (5HIAA), em corpo estriado de camundongos, após tratamento de 15 dias com *Hoodia gordonii* (25 e 50mg/kg), via oral. Após 1 hora de tratamento, os animais foram sacrificados e dissecados para a retirada do corpo estriado. A determinação da monoamina e seu metabólito foram feitas pela técnica de HPLC com detecção eletroquímica. Os resultados (nm/g de tecido) são expressos como média \pm EPM. Para análise estatística foi utilizado ANOVA e teste Student Newman's Keul *post hoc*. Valores significativos * $p < 0,05$, quando comparados ao controle.

A Figura 33 mostra a concentração de dopamina (DA), em corpo estriado de camundongos após tratamento com *Hoodia gordonii*, por 15 dias, nas doses de 25 [5,46 \pm 0,88 (7)] e 50mg/kg [7,61 \pm 0,50 (7)*] através da técnica do HPLC. Observa-se que ocorreu um aumento na dose de 50 em relação ao controle [4,66 \pm 0,91 (7)].

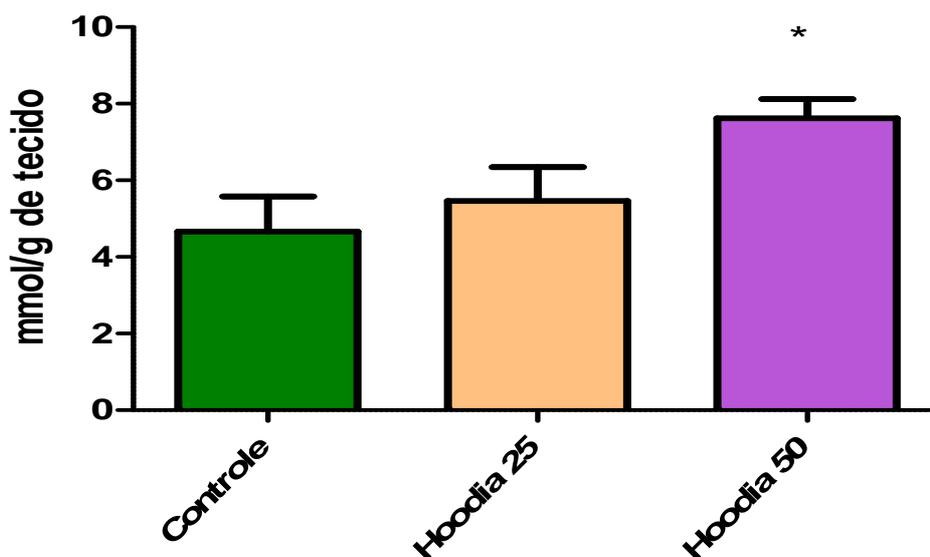


FIGURA 33- Determinação da concentração de dopamina (DA) em corpo estriado de camundongos após tratamento de 15 dias com *Hoodia gordonii* (25 e 50mg/kg) via oral. Depois de 1 hora de tratamento, os animais foram sacrificados e dissecados para a retirada do corpo estriado. A determinação das monoaminas foi feita pela técnica de HPLC com detecção eletroquímica. Os resultados (nm/g de tecido) são expressos como média \pm EPM. Para análise estatística foi utilizado ANOVA e teste Student Newman's Keul *post hoc*. Valores significativos * $p < 0,05$, quando comparados ao controle.

A Figura 34 demonstra a concentração de ácido dihidroxifenilacético (DOPAC), um metabólito da dopamina, em corpo estriado de camundongos, após tratamento com *Hoodia gordonii*, por 15 dias, através da técnica do HPLC. Pode-se ver que não ocorreu alteração em ambas as doses de 25 [3,48 \pm 0,48 (7)] e 50mg/kg [3,92 \pm 0,89 (7)] em relação ao controle [3,38 \pm 0,41 (7)]. Em relação à concentração de ácido 4-hidroxi-3-metoxi-fenilacético (HVA), outro metabólito da dopamina, em corpo estriado de camundongos após tratamento com *Hoodia gordonii*, por 15 dias, também não ocorreu alteração nas doses de 25 [2,22 \pm 0,67 (7)] e 50mg/kg [3,32 \pm 0,54(7)] em relação ao controle [1,88 \pm 0,30(7)].

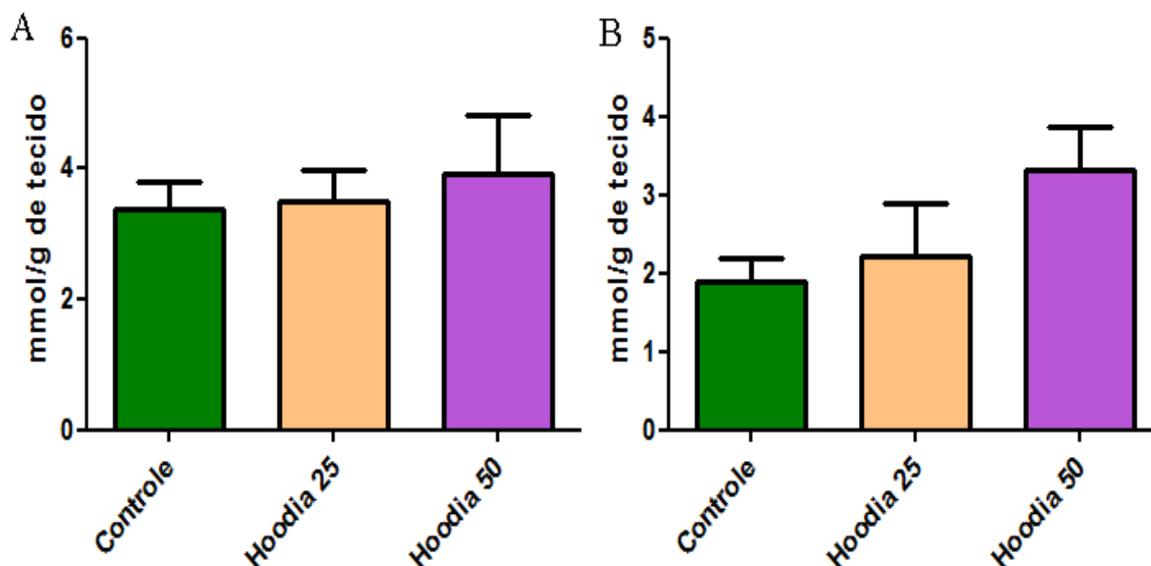


FIGURA 34- Determinação da concentração de ácido dihidroxifenilacético (DOPAC - A) e ácido 4-hidroxi-3-metoxi-fenilacético (HVA-B), metabólitos da dopamina em corpo estriado de camundongos após tratamento de 15 dias com *Hoodia gordonii* (25 e 50mg/kg) via oral. Após a realização dos testes os animais foram sacrificados e dissecados para a retirada do corpo estriado. A determinação dos metabólitos foi feita pela técnica de HPLC com detecção eletroquímica. Os resultados (nm/g de tecido) são expressos como média \pm EPM. Para análise estatística foi utilizado ANOVA e teste Student Newman's Keul *post hoc*.

As Tabelas 02, 03 e 04 mostram a taxa de metabolização dos metabólitos das monoaminas dopamina e serotonina. Ao observar os valores na Tabela 02, percebe-se que houve uma redução na metabolização significativa no HVA/DA na dose de 50mg/kg [$0,42 \pm 0,05$ (7)*], comparado ao grupo controle [$0,93 \pm 0,17$ (7)], após 1 dia de tratamento. A Tabela 03, tratamento com *Hoodia gordonii* por 8 dias, também revela uma redução no DOPAC/DA, na dose de 50mg/kg [$0,74 \pm 0,32$ (7)*], em relação ao controle [$0,90 \pm 0,07$ (7)] e no 5HIAA/5HT na dose de 50 mg/kg [$0,32 \pm 0,02$ (7)**] comparado ao controle [$0,49 \pm 0,11$ (7)]. E a Tabela 04 mostra o tratamento de 15 dias, DOPAC/DA [$0,97 \pm 0,25$ (7)*] apresentou um aumento, em relação ao grupo controle [$0,62 \pm 0,07$ (7)].

TABELA 02 - Taxa de metabolização de monoaminas dopamina e serotonina em corpo estriado de camundongos após tratamento de *Hoodia gordonii* por 1 dia.

Taxa metabolização monoaminas	Controle	Hoodia 25	Hoodia 50
DOPAC/DA	0,82±0,26	1,15±0,25	0,81±0,26
HVA/DA	0,93±0,17	0,84±0,23	0,42±0,05*
5HIAA/5HT	0,96±0,21	0,77±0,14	0,48±0,09

Nota: Os resultados são expressos como média ± EPM. Para análise estatística foi utilizado teste Student t. Valores significativos *p<0,05, quando comparados ao controle.

TABELA 03 - Taxa de metabolização de monoaminas dopamina e serotonina em corpo estriado de camundongos após tratamento de *Hoodia gordonii* por 8 dias.

Taxa metabolização monoaminas	Controle	Hoodia 25	Hoodia 50
DOPAC/DA	0,90±0,07	0,91±0,14	0,74±0,32*
HVA/DA	0,86±0,37	0,94±0,22	0,87±0,21
5HIAA/5HT	0,49±0,11	0,32±0,02**	0,38±0,08

Nota: Os resultados são expressos como média ± EPM. Para análise estatística foi utilizado teste Student t. Valores significativos *p<0,05 e **p<0,01, quando comparados ao controle.

TABELA 04 - Taxa de metabolização de monoaminas dopamina e serotonina em corpo estriado de camundongos após tratamento de *Hoodia gordonii* por 15 dias.

Taxa metabolização monoaminas	Controle	Hoodia 25	Hoodia 50
DOPAC/DA	0,62±0,07	0,97±0,25*	0,50±0,11
HVA/DA	0,62±0,24	0,58±0,17	0,44±0,29
5HIAA/5HT	0,94±0,25	0,78±0,27	1,07±0,22

Nota: Os resultados são expressos como média ± EPM. Para análise estatística foi utilizado teste Student t. Valores significativos *p<0,05, quando comparados ao controle.

5.6. Avaliação dos efeitos de *Hoodia gordonii* sobre o estresse oxidativo em hipocampo de camundongos

5.6.1. Determinação dos níveis de Nitrito

A Figura 35 mostra redução dos níveis de nitrito em hipocampo de camundongos após 1, 8 e 15 dias de tratamento com *H. gordonii* [dose de 25mg/kg (1 dia: $16,67 \pm 2,95^*$ (8); 8 dias: $12,54 \pm 2,65^{**}$ (8); 15 dias: $10,96 \pm 2,52^{**}$ (7)) e de 50mg/kg (1 dia: $12,14 \pm 2,02^*$ (8); 8 dias: $12,14 \pm 3,02^*$ (8); 15 dias: $10,23 \pm 2,66$ (7)] quando comparado aos seus respectivos controles [1 dia: $28,27 \pm 4,95$ (7); 8 dias: $28,37 \pm 5,27$ (8); 15 dias: $21,96 \pm 2,15$ (8)].

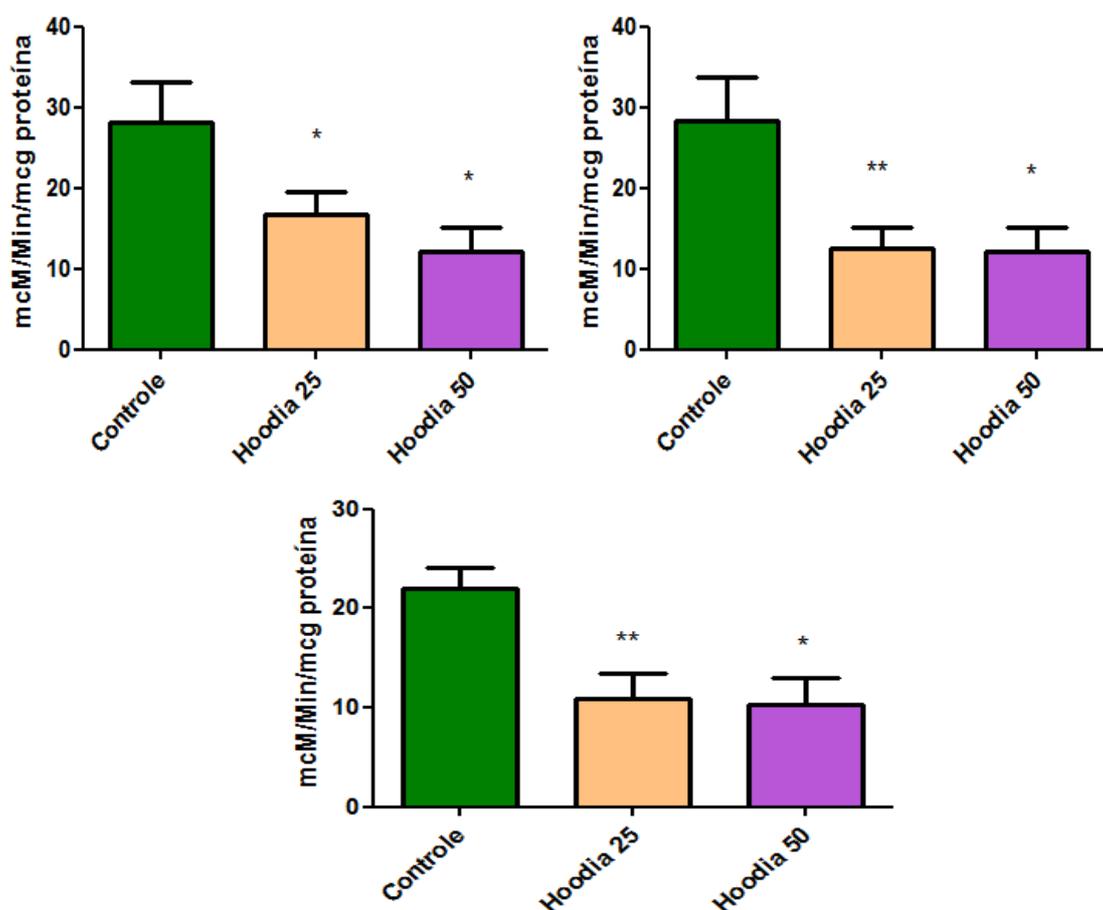


FIGURA 35- Níveis de nitrito em hipocampo de camundongos após administração de *Hoodia gordonii* via oral por 1, 8 e 15 dias. Após administração de *H. gordonii* os animais foram sacrificados e dissecados para a retirada do hipocampo. Os resultados são expressos como média \pm EPM. Para análise estatística foi utilizado ANOVA e teste Student Newman Keuls *post hoc*. Valores significativos * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$, quando comparados ao controle.

5.6.2 Determinação dos níveis de Glutathiona Reduzida (GSH)

A Figura 36 mostra os níveis de glutathiona reduzida (GSH) em hipocampo de camundongos após 1, 8 e 15 dias de tratamento com *Hoodia gordonii*. Observa-se que na dose de 25mg/kg [1 dia: 1758±177 (8); 8 dias: 1440±149(8); 15 dias: 1586±165 (8)] e de 50mg/kg [1 dia: 1718±254(8); 8 dias: 1504±146(8); 15 dias: 1775±228 (8)] não houve alteração significativa quando comparado ao controle [1 dia: 1577±199(8); 8 dias: 1426,±225(8); 15 dias: 1696±207(8)].

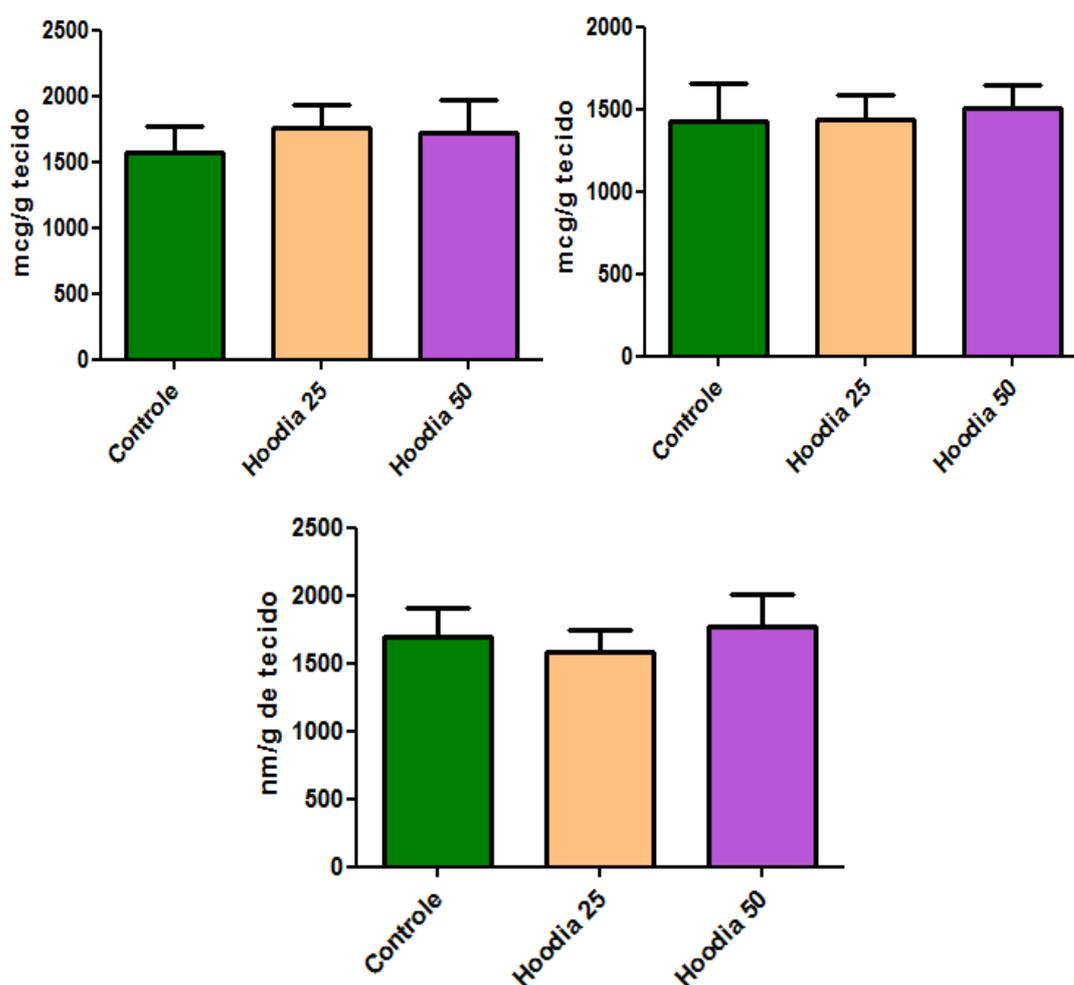


FIGURA 36 – Efeito sobre os níveis de glutathiona reduzida (GSH) em hipocampo de camundongos após administração de *Hoodia gordonii* via oral por 1, 8 e 15 dias. Após administração de *H. gordonii* os animais foram sacrificados e dissecados para a retirada do hipocampo. Os resultados são expressos como média ± EPM. Para análise estatística foi utilizado ANOVA e teste Student Newman Keuls *post hoc*.

5.6.3 Determinação da atividade da enzima Catalase

Na Figura 37, observa-se a atividade da enzima catalase em hipocampo de camundongos após 1, 8 e 15 dias de tratamento com *Hoodia gordonii*. Não houve alteração em nenhum dos tempos de tratamento [25mg/kg (1 dia: $139 \pm 18,87(8)$; 8 dias: $141,00 \pm 17,48$; 15 dias: $127,30 \pm 16,96(8)$) e de 50mg/kg [(1 dia: $126 \pm 13,38(8)$; 8 dias: $136,70 \pm 10,59(8)$; 15 dias: $135,80 \pm 11,60(8)$] quando comparado ao controle [1 dia: $138 \pm 11,5(8)$; 8 dias: $127,40, \pm 14,92(8)$; 15 dias: $127,40 \pm 14,92(8)$].

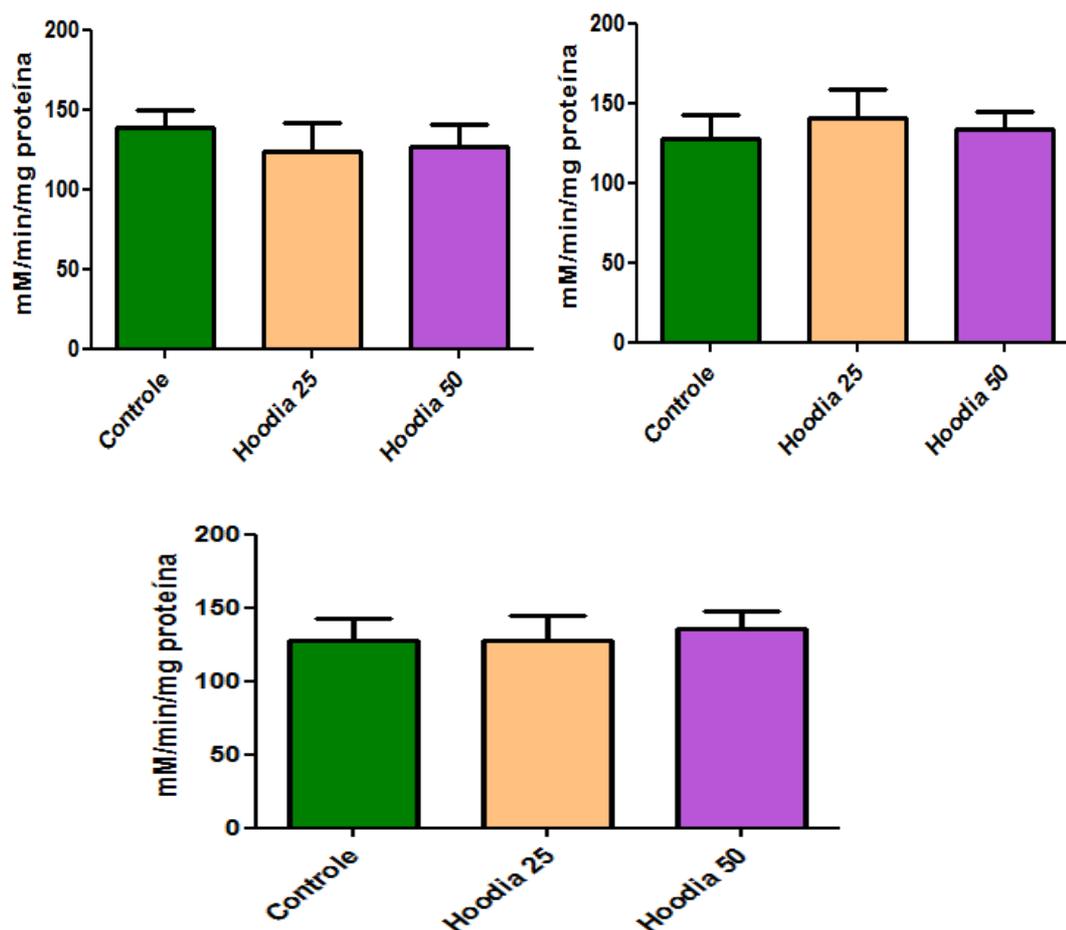


FIGURA 37 – Efeito sobre a atividade da enzima catalase em hipocampo de camundongos após administração de *Hoodia gordonii*, via oral por 1, 8 e 15 dias. Após administração de *H. gordonii* os animais foram sacrificados e dissecados para a retirada do hipocampo. Os resultados são expressos como média \pm EPM. Para análise estatística foi utilizado ANOVA e teste Student Newman Keuls *post hoc*.

5.6.4 Determinação dos níveis de Malonildialdeído

Na Figura 38 observa-se os níveis de malonildialdeído (MDA) em hipocampo de camundongos após 1, 8 e 15 dias de tratamento com *Hoodia gordonii*. Não houve alteração dos valores de MDA na dose de 25mg/kg [1 dia: $10,27 \pm 1,97(8)$; 8 dias: $8,60 \pm 1,52(8)$; 15 dias: $36,68 \pm 4,45(8)$] e de 50mg/kg [1 dia: $8,84 \pm 1,27(8)$; 8 dias: $9,89 \pm 1,53(8)$; 15 dias: $33,79 \pm 3,45(8)$] quando comparado ao controle [1 dia: $12,30 \pm 2,57(8)$; 8 dias: $11,30 \pm 1,09(8)$; 15 dias: $30,58 \pm 1,14(8)$].

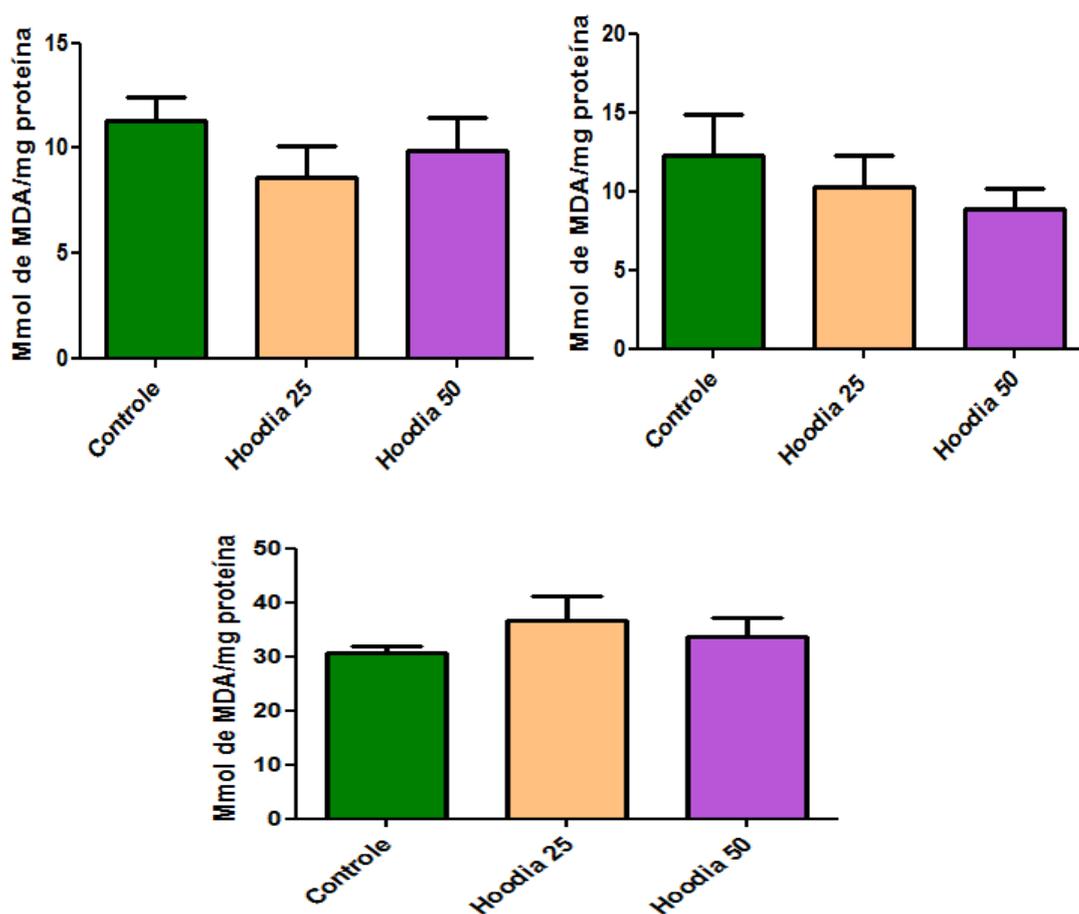


FIGURA 38– Efeito sobre os níveis de malonildialdeído em hipocampo de camundongos após administração de *Hoodia gordonii* via oral por 1, 8 e 15 dias. Após administração de *H. gordonii* os animais foram sacrificados e dissecados para a retirada do hipocampo. Os resultados são expressos como média \pm EPM. Para análise estatística foi utilizado ANOVA e teste Student Newman Keuls *post hoc*.

5.7. Avaliação dos efeitos de *Hoodia gordonii* sobre parâmetros bioquímicos

Hoodia gordonii (25 e 50mg/kg), via oral, foi administrado por 15 dias consecutivos e, após 1, 8 e 15 dias, foi coletado amostra sanguínea para testes bioquímicos. A Tabela 05 mostra que, na dose de 25mg/kg houve uma redução dos níveis de transaminase glutâmico oxalacética (TGO), após os 01 dia de administração quando comparado ao controle [controle: $61,00 \pm 2,19$ (8); dia 1: $60,00 \pm 2,35^*$ (8); dia 8: $59,13 \pm 3,28$ (8); dia 15: $63,50 \pm 3,38$ (8)]. E na dose de 50mg/kg, observou-se que no dia 8 [$65,22 \pm 3,70$ (8)*] e no dia 15 [$63,75 \pm 4,23$ (8)*] houve redução dos níveis de TGO em relação ao controle [$79,11 \pm 2,61$ (8)]. No dia 1 não houve alteração [$72,67 \pm 3,45$ (8)].

Foi verificado os níveis de TGP na dose de 25 mg/kg após dia 1 [$28,88 \pm 1,90$ (8)], após dia 8 [$29,75 \pm 2,05$ (8)] e dia 15 [$38,13 \pm 1,60$ (8)] não houve alteração dos valores, quando comparados ao controle [$33,11 \pm 1,85$ (8)]. Já na dose de 50mg/kg observou-se um aumento após dia 8 [$36,22 \pm 2,27$ (8)*] e dia 15 [$39,44 \pm 1,70$ (8)*] em relação ao controle [$30,11 \pm 1,44$ (8)] e nenhuma alteração com 1 dia de administração [$30,89 \pm 1,34$ (8)].

Em relação aos níveis séricos de glicose, *Hoodia gordonii* na dose de 25mg/kg causou um aumento destes níveis no dia 1 de administração [$109,30 \pm 3,88$ (8)] e no dia 8 [$96,75 \pm 4,62$ (8)] em comparação com o controle [$83,63 \pm 2,01$ (8)], já com 15 dias de tratamento [$90,63 \pm 3,40$ (8)] não houve alteração. Na dose de 50mg/kg houve aumento após dia 1 [$112,5 \pm 3,69$ (8)], dia 8 [$115,0 \pm 3,92$ (8)] e dia 15 [$123,30 \pm 6,32$ (8)] quando comparados com o controle [$78,50 \pm 3,40$ (8)].

Os níveis séricos de colesterol após 1 e 8 dias de administração de *Hoodia gordonii* 25mg/kg não foram alterados {1dia [$48,86 \pm 3,43$ (8)], 8 dias [$75,63 \pm 4,57$ (8)]} e 15 dias [$75,50 \pm 3,46$ (8)*] houve um aumento. Na dose de 50mg/kg após 8 dias de tratamento [$73,22 \pm 4,17$ (8)*] houve um aumento em relação ao controle [$58,44 \pm 3,69$ (8)], o que não foi observado após o dia 1 [$56,22 \pm 3,15$ (8)] e dia 15 [$66,56 \pm 2,11$ (8)].

Foi observada uma redução nos níveis séricos de triglicérides após administração de *Hoodia gordonii*, na dose de 25mg/kg com 01 dia de tratamento [$43,25 \pm 4,15$ (8)*] em relação ao controle [$75,67 \pm 9,45$ (8)]. Com 8 dias [$87,50 \pm 6,89$ (8)] e 15 dias de tratamento [$109,0 \pm 13,12$ (8)] não foi observada qualquer mudança significativa. Na dose de 50mg/kg, houve uma redução após 1 dia [$48,75 \pm 3,34$ (8)*], em relação ao controle [$77,22 \pm 9,96$ (8)], o que não ocorreu após 8 dias [$86,67 \pm 9,33$ (8)] e 15 dias [$68,50 \pm 9,82$ (8)],

TABELA 05 - Análise bioquímica dos níveis séricos de glicose, TGO, TGP, colesterol total e triglicérides após administração de *Hoodia gordonii* por via oral durante 15 dias em ratos.

Grupo	Glicose (mg/dL)	TGO/AST (U/L)	TGP/ALT (U/L)	Total Colesterol (mg/dL)	Triglicérides (mg/dL)
C (25)	83.63±2.01	61.00±2.19	33.11±1.85	61.11±5.14	75.67±9.45
C (50)	78.50±3.40	79.11±2.61	30.11±1.44	58.44±3.69	77.22±9.96
25 (1 d)	109.30±3.88*	60.00±2.35*	28.88±1.90	48.86±3.43	43.25±4.15*
50 (1 d)	112.50±3.69*	72.67±3.45	30.89±1.34	56.22±3.15	48.75±3.34*
25 (8 d)	96.75±4.62*	59.13±3.28	29.75±2.05	75.63±4.57	87.50±6.89
50 (8 d)	115.00±3.92*	65.22±3.70*	36.22±2.27*	73.22±4.17*	86.67±9.33
25(15d)	90.63±3.40	63.50±3.38	38.13±1.60	75.50±3.46*	98.14±8.50
50(15d)	123.30±6.32*	63.75±4.23*	39.44±1.70*	66.56±2.11	68.50±9.89

Nota: Controle (veículo), *Hoodia gordonii* 25 e 50 mg/kg foram administrados por 15 dias e amostras sanguíneas foram coletadas 1 dia antes da administração e após 1, 8 e 15 dias de administração. Os valores da tabela apresentam a média ± EPM. Para análise estatística foi utilizado teste Student t. Valores significativos *p<0,05 comparados ao controle.

5.8 Análise histopatológica de tecidos expostos a *Hoodia gordonii* em altas concentrações

Os animais foram tratados com *Hoodia gordonii* nas doses de 550 e 2000mg/kg, uma única vez, e em seguida, foram sacrificados e retirados os seguimentos hipocampo, fígado e rim para a análise histopatológica (Figura 39). A tabela 06 revela que ocorreu alteração no hipocampo na dose de 2000 [2,5 (2-3)*] em comparação ao controle.

TABELA 06 – Escores das alterações histopatológicas de hipocampo de camundongos após tratamento de *Hoodia gordonii*.

GRUPOS	ESCORES
Controle	0
H 550mg/kg	2 (2)
H2000 mg/kg	2,5 (2-3)*

Nota: Os animais foram tratados com *Hoodia gordonii* nas doses de 550 e 2000mg/kg v.o., dose única e após 14 dias os hipocampos foram removidos e as alterações histopatológicas foram avaliadas de acordo com os critérios descritos por GILAT *et al.* (2005): (0) Morfologia normal; (1) Dano menor: edema, poucas células pinocíticas; (2) Dano moderado: desorganização estrutural, edema, moderadas células pinocíticas, vacuolização, infiltrado inflamatório; (3) Dano intenso: desorganização estrutural, edema, quantidade intensa de células com pinocitose, vacuolização, infiltrado inflamatório.

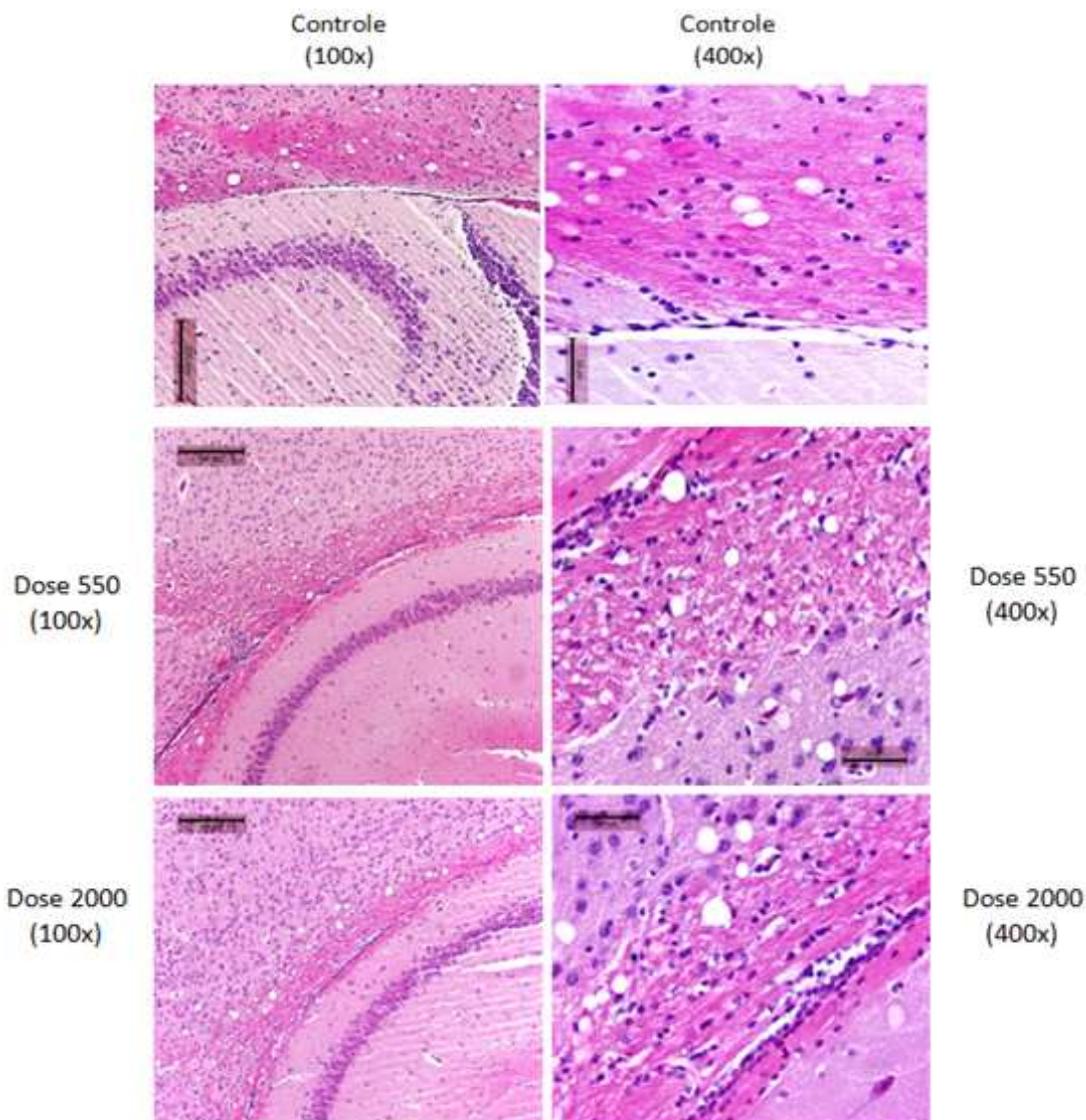


FIGURA 39 – Efeito de *Hoodia gordonii* em hipocampo de camundongos após tratamento nas doses de 550 e 2000mg/kg. Análise microscópica de hipocampo com ampliação de 100 e 400x em cada grupo. Animais foram tratados com salina, *Hoodia gordonii* 550mg/kg e 2000mg/kg. Os resultados quantitativos desta análise são apresentados na tabela 06.

5.9 Avaliação do potencial citotóxico de *Hoodia gordonii*

A Figura 40 vem mostrar a avaliação de citotoxicidade realizada em linfócitos humanos, através do ensaio de MTT. As células foram expostas ao extrato *Hoodia gordonii* em uma concentração de 50, 100 e 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ por um período de até 72h e foi observado que doses acima de 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ observa-se uma redução da viabilidade celular.

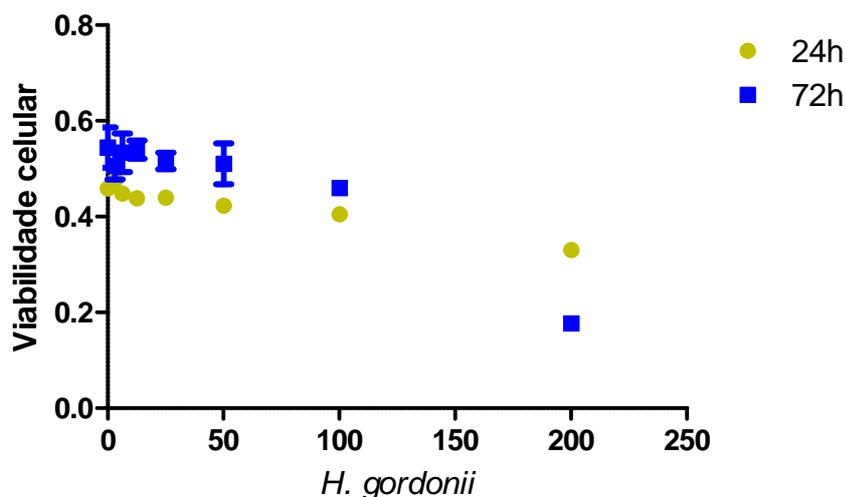


FIGURA 40 – Avaliação dos efeitos de *Hoodia gordonii* em linfócitos humanos periféricos expostos ao composto por 24 e 72h através do ensaio do MTT. Os experimentos foram analisados segundo suas médias a partir da regressão não linear. Cada amostra foi testada em triplicata em três experimentos independentes.

Na Figura 41, verifica-se o ensaio cometa realizado em linfócitos humanos, expostos a *Hoodia gordonii* na concentração de até 200µg/mL, que apresentou valores semelhantes ao grupo controle. Já a doxorubicina que foi utilizada como padrão positivo, e causou lesão ao DNA (Controle: 12,00±1,00; Doxo: 138,00±28,00; *Hoodia* 200: 9,00±0,00; *Hoodia* 100: 4,00±0,00; *Hoodia* 50: 28,00±8,00).

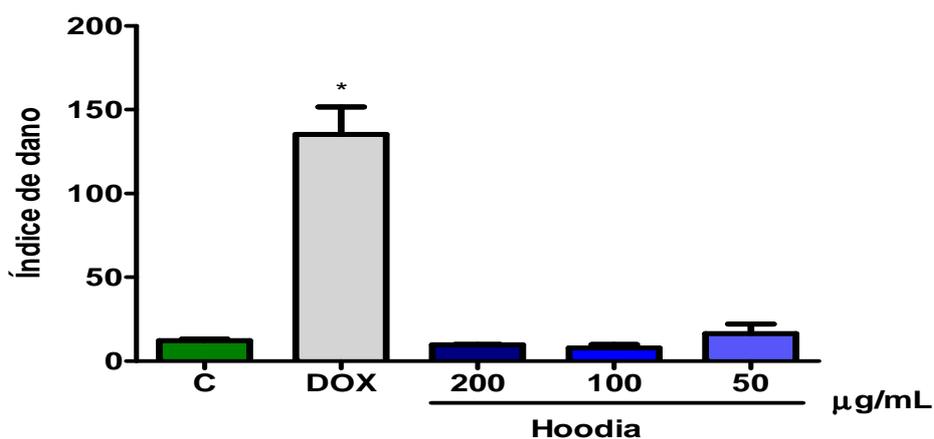


FIGURA 41 – Índice de dano ao DNA de linfócitos humanos expostos 24h a *Hoodia gordonii*. RPMI foi utilizado como controle negativo e doxorubicina (Doxo) na concentração de 0,6 µM foi utilizado como controle positivo. Os dados correspondem a média ± erro padrão de quatro experimentos independentes. *p<0,05 comparado com o controle negativo por ANOVA Newman Keuls.

6. DISCUSSÃO

A presente pesquisa utilizou duas espécies de animais, ratos e camundongos. Devido à dificuldade de se trabalhar apenas com ratos, os experimentos possíveis foram realizados em camundongos *Swiss*. A literatura revela que muitos estudos relacionados à obesidade podem ser realizados nestes grupos de animais, pois estes são sensíveis aos efeitos agudos de fármacos que atuam nas monoaminas (HALFORD *et al.*, 2010). Foram utilizados neste estudo, diferentes períodos de tratamento com o extrato: 01, 08 e 15 dias, pois foi comprovado na literatura que, as anfetaminas quando administradas de forma aguda promovem liberação de noradrenalina e dopamina (ALEXANDER *et al.*, 2005). *Hoodia gordonii* poderia mostrar resultados diferentes dependendo do período de administração.

Hoodia gordonii passou a ser consumida na África durante a década de 80, como supressora do apetite, e hoje ainda é consumida em vários países, em diversas formulações. Com o objetivo de verificar sua propriedade anorexígena, foi administrada em ratos por 15 dias consecutivos e realizada a verificação do peso diariamente. Foi observada uma redução significativa no peso dos animais tratados em ambas as doses utilizadas (25 e 50mg/kg, via oral), em comparação com o grupo controle. A escolha por estas doses baseou-se de acordo com uma escala de doses realizada por trabalho prévio de nosso laboratório (MOURA, 2012), no qual, observou-se uma redução dose dependente do peso de animais nas doses de 25, 50, 100 e 200mg/kg, via oral. Desse modo, com o intuito de reduzir a quantidade necessária de droga, devido à dificuldade de oferta, optou-se por utilizar as menores doses testadas que já mostraram efeito. A redução de peso causada por *H. gordonii* também foi observada por outros pesquisadores, Dent *et al.*, (2012) que utilizou 3 doses (5, 15, e 50mg/kg), em ratas gestantes, identificou a dose de 50mg/kg, como sendo a dose que promoveu uma maior perda de peso nos animais.

Neste período de tratamento foi avaliada também a ingestão de água e comida dos animais diariamente e foi possível identificar uma redução significativa da ingestão de alimento e água neste período, que pode ser uma das causas de redução do peso destes animais. Nossos resultados confirmam dados encontrados na literatura referida acima. Este resultado foi encontrado também no estudo de Moura (2012), após tratamento com *Hoodia gordonii* por 8 dias. Em outro tratamento mais prolongado, de 13 semanas, verificou-se uma redução do peso corporal do animal, bem como redução da ingestão alimentar (NICHOLSON

et al., 2007). Em estudo clínico foi observado uma redução de aproximadamente 30% no consumo de energia (RICHARDS & GROVER, 2003).

Estudos demonstraram que a ação supressora do apetite o extrato de *H. gordonii* deve-se a presença do elemento denominado P57. Em trabalho prévio (Mc LEAN & LUO, 2004) foi demonstrado que, a injeção intraventricular de P57 em animais levou a produção de ATP em neurônios presentes no hipotálamo, regulando assim a ingestão alimentar do organismo. Sabe-se que o ATP pode controlar os mecanismos de homeostase do hipotálamo, em particular, regulando a osmolaridade e a temperatura corporal (Mc LEAN & LUO, 2004). Estudo recente indica que o P57 é um esteróide glicosídico extraído de *Hoodia gordonii*, que pode ativar o receptor em seres humanos (TAS2R14) e induzir a liberação do peptídeo colecistocinina (CCK) nas células intestinais (HuTu-80) de ratos, tanto *ex vivo*, como *in vivo*, como em cultura de células humanas enteroendócrinas da linhagem (HuTu-80), conseqüentemente atuando na supressão do alimento (NEVÉ; COLLINS & MORGAN, 2010).

Existem hoje no mercado inúmeros fármacos utilizados no tratamento da obesidade, sendo a sibutramina um deles. Em estudo experimental, onde se administrou o enantiômero dextrógero (D) da sibutramina, desmetilsibutramina e didesmetilsibutramina, observou-se uma redução do peso corporal e da ingestão de água e ração. Vale ressaltar que o tratamento com os enantiômeros levógeros (L) não causou nenhuma alteração nos animais (GLICK *et al.*, 2000). Entretanto, o uso desta substância é atualmente mais restrito, desde que seu uso aumentou exponencialmente e inúmeros eventos adversos, principalmente os eventos cardiovasculares foram descobertos. Outro grupo de fármacos muito utilizado para reduzir o peso eram as anfetaminas, hoje retirada do mercado devido aos diversos efeitos adversos. Um estudo utilizou um derivado nitroso da fenfluramina, uma anfetamina, o n-nitrosafenfluramina, em camundongos e não foi capaz de alterar o peso nem a ingestão de comida dos animais (SATOH *et al.*, 2006). Diante deste contexto, podemos salientar que, os resultados da presente pesquisa são promissores, visto que *H. gordonii* foi capaz de reduzir o peso corporal, bem como a ingestão de água e comida dos animais, podendo ser um potencial fármaco para o uso na obesidade.

Uma pesquisa que utilizou o extrato de *Chemerim*, observou uma redução da ingestão de comida no sexto dia de administração, reduzindo assim, o peso corporal do animal

(BRUNETTI *et al.*, 2014). Nossos resultados mostraram uma redução do peso do animal após 4 dias de administração do extrato.

Tanto a sibutramina como as anfetaminas foram retiradas do mercado devido aos inúmeros efeitos adversos, dentre eles a ansiedade. Diante disto, a presente pesquisa buscou investigar se o uso de *Hoodia gordonii* nos animais causaria comportamento relacionado à ansiedade. E foi identificado um comportamento ansiogênico nos animais após administração de *Hoodia gordonii*, após o tratamento nos 3 períodos. Diazepam foi usado como droga padrão positivo, que promove um efeito ansiolítico, diferentemente da ação do extrato utilizado.

Para avaliar a ansiedade em animais, vários testes foram desenvolvidos, como por exemplo, o labirinto em cruz elevado (LCE), constituído de dois braços abertos e dois braços fechados, em formato de cruz, um dos modelos animais mais utilizados. Este teste baseia-se no comportamento espontâneo do animal de aversão ao ambiente, causado pelo medo e ansiedade, induzido pelo espaço, ou braço aberto (TREIT; MENARD & ROYAN, 1993), iluminado e alto (BUSH & VACCARINO, 2007). Os roedores quando se encontram neste aparato apresentam uma aversão em explorar o braço aberto, causado principalmente pelo medo, do que pela altura do aparelho (PELLOW *et al.*, 1985; FERNANDES & FILE, 1996). O modelo utilizado tem validação comportamental, fisiológica e farmacológica, para ratos (PELLOW *et al.*, 1985) e para camundongos (LISTER, 1987). Este teste tem sido bastante utilizado, por ser um procedimento rápido e simples, para detectar efeito ansiolítico, ou ansiogênico de drogas, em modelos animais (BARBOSA *et al.*, 2008). Nele, as drogas ansiolíticas clássicas, como os benzodiazepínicos, e ansiogênicas, como os antagonistas dos receptores benzodiazepínicos, aumentam e reduzem, respectivamente, a exploração do animal nos braços abertos (HANDLEY & MITHANI, 1984), caracterizando um comportamento ansiolítico, ou ansiogênico respectivamente.

Sabe-se que no animal, embora não se possa provar que o mesmo vivencia a ansiedade igualmente ao ser humano, esta é bem representada nos testes comportamentais induzidos por situação estressante quando, neste caso, a ansiedade prepara o animal para a fuga ou luta (OHL, 2003). Desta forma, no presente estudo foi observado que a administração por gavagem de *Hoodia gordonii* em camundongos, os animais apresentaram uma redução nos parâmetros relacionados aos braços abertos (NEBA, PEBA, TPBA, PTBA), sugerindo um comportamento ansiogênico.

Corroborando com os resultados do presente estudo, a administração de uma dose de sibutramina em ratos, não foi capaz de alterar os parâmetros no teste do labirinto em cruz elevado (FRASSETO *et al.*, 2010; SANTOS *et al.*, 2014). Em relação ao uso de anfetaminas em animais, resultados contraditórios foram encontrados, como a observação de um efeito ansiolítico por DAWSON *et al.* (1995) e nenhum efeito significativo com LISTER (1987). E um estudo realizado com o extrato do chá verde, uma planta descrita por possuir atividade anorexígena, identificou-se que ratos *Wistar* tratados por cinco semanas apresentaram um efeito ansiolítico, como detectado pelo aumento do tempo de permanência nos braços abertos (MIRZA *et al.*, 2013). Estes dados discordantes podem ser decorrentes de vários fatores como dose, via de administração, diferentes raças de roedores utilizados, ao protocolo experimental utilizado, entre outros fatores, que podem interferir nos resultados (SALAS *et al.*, 2003).

Para investigar uma possível relação do efeito ansiogênico com o comportamento exploratório do animal, foi realizado o teste do campo aberto. Com relação à atividade locomotora, não se observou nenhuma alteração no número de cruzamentos, em ambas as doses de *H. gordonii*, após 1 e 8 dias de tratamento, indicando que o efeito ansiogênico, causado após 8 dias, não está relacionado às alterações na atividade locomotora do animal. No entanto, após 15 dias de tratamento houve uma redução do número de cruzamentos em ambas as doses, deixando em dúvida o efeito ansiogênico por si só. Esta redução na atividade locomotora pode estar de certa forma, relacionada com uma redução da liberação de monoaminas, entretanto, no presente estudo houve um aumento na liberação das monoaminas, o que pode ser visto mais adiante, em outros testes, como a quantificação dos níveis de monoaminas. Foi administrado o diazepam, como padrão positivo e promoveu um aumento da atividade locomotora nos três períodos de tratamento.

O teste do campo aberto é bastante utilizado para avaliar a atividade locomotora dos animais. A tendência natural do animal, quando exposto a um ambiente novo é a de explorá-lo, apesar do estresse e do conflito causado por este ambiente (MONTGOMERY, 1958). Este teste tem como finalidade reduzir a probabilidade de ocorrência de resultados falso-positivos em testes comportamentais posteriores, que avaliam atividade ansiolítica e antidepressiva de drogas, uma vez que a partir dessa avaliação pode-se determinar se a administração da droga teste resulta em alteração do nível de excitabilidade do SNC (MANSUR *et al.*, 1971). Como exemplo, sabe-se que a redução da atividade locomotora espontânea (ALE) pode estar relacionada à sedação, resultante da depressão do SNC (PEREZ *et al.*, 1998), enquanto que, a

elevação deste parâmetro pode estar relacionado a um efeito psicoestimulante. Este modelo permite discutir a especificidade do efeito de uma droga, sendo utilizado para diferentes tipos de drogas, caso elas possuam efeitos estimulante, sedativa, ansiolítica ou ansiogênica (LISTER, 1987; PRUT & BELZUNG, 2003).

A avaliação da atividade locomotora, por exemplo, poderá indicar o nível de excitabilidade do SNC (MANSUR *et al.*, 1971) e, portanto, como referido acima, substâncias psicoestimulantes aumentam este parâmetro, neste teste (MUELLER *et al.*, 1989). Os compostos que aumentam o número de entradas nos braços abertos do LCE, reduzem o comportamento exploratório e atividade locomotora dos animais (PELLOW *et al.*, 1985). Diferente do descrito acima, o presente estudo verificou uma redução da atividade locomotora e uma redução dos parâmetros no braço aberto, após 8 e 15 dias de administração de *H. gordonii*, ou seja, o extrato não reduziu o comportamento exploratório e produziu um efeito ansiogênico, após 15 dias de tratamento.

O *rearing* e o *grooming* são parâmetros que também foram avaliados no teste do campo aberto, nossa pesquisa identificou que o parâmetro de *grooming* foi reduzido em ambas as doses testadas de *H. gordonii*, em todos os tempos de administração e, após 15 dias de tratamento o comportamento de *rearing* também foi reduzido.

O *rearing* é descrito, por alguns autores, como um comportamento estereotipado complexo em roedores, que reflete o comportamento exploratório do animal (JOHANSSON & AHLENIUS, 1989), enquanto outros sugerem que agentes ansiolíticos diminuem o número de *rearing* (HUGHES, 1972; STOUT, 1994). É descrito que, a elevação do comportamento de *grooming* é observada em roedores apreensivos (ARCHER, 1973), e alguns autores relatam que drogas ansiolíticas reduzem o número de *grooming*, em animais no campo aberto (BARROS *et al.*, 1994; DUNN *et al.*, 1981; MOODY, MERALI & CRAWLEY, 1993). Neste sentido, a locomoção, o comportamento de *rearing* e *grooming* em roedores, observados no teste do campo aberto, são os parâmetros comportamentais mais utilizados para descrever as influências dos eventos da vida, ou da administração de fármacos (MONTGOMERY, 1958; ARAKAWA e IKEDA, 1991; REX, STEPHENS & FINK, 1996).

Trabalho prévio mostra que, a administração de baixas doses de anfetamina tendem a causar um aumento da atividade locomotora, enquanto que altas doses promovem um

comportamento estereotipado, o que inclusive permite que a mesma seja utilizada em modelo de psicose. Estes movimentos estereotipados incluem *sniffing*, *rearing*, *grooming*, *freezing* (MARKHAM *et al.*, 2006). Um trabalho recente demonstrou que, o uso agudo de sibutramina não foi capaz de alterar a atividade locomotora do animal (SANTOS *et al.*, 2014), fato semelhante ao ocorrido no presente trabalho, onde o uso de *H. gordonii*, após 1 e 8 dias de tratamento, não alterou este parâmetro.

A atividade de *rearing* em roedores é relatada na literatura como um comportamento estereotipado complexo (DANDIYA *et al.*, 1969) e variável. Alguns autores relataram que o *rearing* reflete um comportamento exploratório do animal (JOHANSSON & AHLENIUS, 1989) e, portanto, substâncias ansiolíticas induziriam um aumento da atividade de *rearing* ou não alterariam este parâmetro (YOUNG & JOHNSON, 1991). Entretanto, outros estudos relacionam o *rearing* com os níveis de excitabilidade do sistema nervoso central (CUNHA & MASUR, 1978), e sugerem que agentes ansiolíticos e sedativos diminuem este parâmetro (HUGHES, 1972; STOUT & WEISS, 1994). *Hoodia gordonii* promoveu uma redução do *rearing*, após 15 dias de tratamento, entretanto *Hoodia gordonii* no teste do labirinto em cruz elevado não promoveu um efeito ansiolítico e sim ansiogênico.

O *grooming* (autolimpeza), segundo a literatura é um tipo de comportamento especificamente induzido, em situações em que um animal está em conflito induzido, pelo estresse ou frustração. Conforme alguns autores, o comportamento de autolimpeza em roedores está relacionado com os receptores de dopamina (D₁) no cérebro (GISPEN e ISAACSON, 1981). A maioria das espécies animais passam uma grande parte do tempo em comportamento de *grooming* (MACFARLAND *et al.*, 1974), DRAGO (1999) mostrou em seu estudo experimental que, a redução do comportamento de *grooming* ocorre em animais deficientes de receptores D₁ (*Knockout*), em contraste com grupos de animais sem a presença de receptor de dopamina D₂, os quais mostraram um nível normal de ativação comportamental. Esta pesquisa sugeriu que os receptores D₁-símile (D₁₋₅) estão estreitamente envolvidos no comportamento de limpeza, diferente dos receptores D₂-símile (D₂₋₄). O presente estudo, portanto não pode descartar a possibilidade de interação de *Hoodia gordonii* com os receptores dopaminérgicos D₁, considerando que houve redução do comportamento de *grooming* nos animais, apesar da literatura mostrar que a redução de dopamina reduz este comportamento.

Outro teste comportamental, utilizado nesta pesquisa, foi o teste do nado forçado,

considerado um modelo animal clássico para *screening* de drogas com efeito antidepressivo (BASSO *et al.*, 2009). Este teste é considerado um modelo de desespero comportamental, no qual os animais são forçados a nadar em um recipiente com água e não há possibilidade de fuga. Na tentativa de escapar, o animal divide seu comportamento em períodos de atividade vigorosa (comportamento de procura) e de imobilidade (comportamento de espera) (STERU *et al.*, 1985). Apesar da relação entre imobilidade (uma postura mantida que reflete um estado de “desespero comportamental” no qual o animal é rendido pelo desejo de escapar) e depressão, ser controversa (GARDIER *et al.*, 2001), é bem demonstrado que drogas com atividade antidepressiva antagonizam, ou seja, diminuem o tempo de imobilidade do animal (PORSOLT *et al.*, 1977; FERNANDEZ-TERUEL *et al.*, 1990). Conforme dados recentes (SEQUEIRA-CORDERO *et al.*, 2014), este teste apresenta uma estreita relação com as monoaminas, pois foi verificado que animais submetidos ao nado forçado, que mostraram uma redução do tempo de imobilidade, apresentavam níveis maiores de dopamina e noradrenalina na região do núcleo *accumbens*, quando comparado ao grupo que não foi submetido ao teste do nado forçado. Estes dados dão suporte ao teste do nado forçado, com um fator estressante, que pode desencadear alterações nos níveis de monoaminas.

Nossos resultados mostraram que o tratamento com *Hoodia gordonii* em camundongos, foi capaz de reverter o tempo de imobilidade, nos três períodos de tratamento, revelando um possível efeito antidepressivo-símile. Este mesmo teste foi realizado por GLICK *et al.* (2000) em ratos, que receberam enantiômeros da sibutramina e os autores identificaram que estas substâncias foram capazes de promover a redução do tempo de imobilidade, assim como a sibutramina, mostrando uma ação antidepressiva, o que também foi verificado no estudo de Li *et al.* (2014). Dados contraditórios foi encontrado em pesquisa clínica de Perrio *et al.* (2007), na qual observou-se o surgimento de depressão em 0,8% da amostra, uma percentagem bem reduzida, mas que pode estar associado ao uso deste fármaco.

Sabe-se que, a obesidade é uma patologia que pode estar associada ao desenvolvimento da depressão, pois ambas as patologias envolvem elementos fisiopatológicos comuns, relacionados aos sistemas noradrenérgico e dopaminérgico (HAINER *et al.*, 2006; KALIA, 2005). Esta relação das monoaminas com o desenvolvimento da obesidade foi observada em uma pesquisa realizada com adolescentes, que conseguiu identificar, através da análise de DNA da saliva, uma relação entre o desenvolvimento da obesidade/ sobrepeso com o transportador de serotonina (SLC64A), bem como, uma relação entre a forma ativa do gene da

monoamina oxidase A (MAOA), enzima que degrada as monoaminas, e a redução do aparecimento da obesidade (FUEMMELER *et al.*, 2009). Estas pesquisas vêm mostrar uma estreita relação do surgimento da obesidade com as monoaminas. Uma vez que a depressão está associada com baixos níveis de monoaminas e seus metabólitos, acredita-se que esta redução também possa ocorrer durante a obesidade (HYLAND, 2008).

Em estudo clínico realizado com mulheres obesas que fizeram uso de medicamentos como dietilpropiona, femproporex, sibutramina, fluoxetina e mazindol, utilizados no tratamento da obesidade, verificou-se uma melhora nos escores de depressão e ansiedade (SUPLICY *et al.*, 2013). Estes resultados positivos podem também estar relacionados com a redução do peso destas mulheres.

Os resultados com a sibutramina são inúmeros. Em uma pesquisa clínica com 36 indivíduos, que utilizaram a sibutramina por seis semanas, observou-se uma redução da depressão, de acordo com a escala de compreensão psicopatológica e argumentou-se que esta melhora não estava associada à redução do peso (ELFHAG *et al.*, 2006). Por outro lado, um estudo mostrou que, a sibutramina pode levar ao desenvolvimento da depressão, estudo de coorte com 28.357 sujeitos, em que 30,3% fizeram uso de orlistat e 41,8% de sibutramina, identificou o surgimento de depressão em 0,8% dos pacientes que usaram sibutramina (PERRIO; WILTON & SHAKIR, 2007). Outra pesquisa também identificou o surgimento da depressão (FAULCHONBRIDGE *et al.*, 2009), e associaram estes sintomas a uma frustração de perda de peso pequena.

Vários estudos identificaram que a fentermina, um derivado anfetamínico, promoveu alterações do humor. De quatro casos estudados, foi descoberto que, três apresentaram episódios maníacos (RAISON & CLAIN, 1997). Uma pesquisa identificou um caso de depressão em paciente que usou fentermina associada à fluoxetina (BOSTWICK & BROWN, 1996), e o surgimento de episódios maníacos em paciente que não apresentava história prévia de desordens afetivas (CLEARE, 1996). Outra pesquisa realizada com 50 mulheres revelou o surgimento de um (01) caso de sintomas depressivos, após o uso do medicamento (DOUGLAS *et al.*, 1983).

O uso de antagonista da melanocortina (SNAP 7941), com atividade anorexígena, mostrou que esta substância reduziu o tempo de imobilidade no teste do nado forçado, após a administração de uma dose (BOROWSKI *et al.*, 2002), apresentando um efeito antidepressivo,

e no teste de interação social foi verificado uma atividade ansiolítica do fármaco. Nossos resultados mostraram que, *H. gordonii* apresentou uma redução no tempo de imobilidade, no nado forçado já no teste do labirinto em cruz elevado, os animais apresentaram um efeito ansiogênico, o que pode estar relacionado ao aumento de monoaminas, que será relatado mais adiante.

Considerando que os animais tratados com *Hoodia gordonii* apresentaram um efeito antidepressivo, e que este efeito pode estar relacionado com os níveis de monoaminas, visto que estes neurotransmissores participam da fisiopatologia de inúmeras desordens, procuramos investigar uma possível relação do mecanismo de *H. gordonii* com receptores monoaminérgicos, para isto, utilizando antagonistas dopaminérgicos, noradrenérgicos e serotoninérgicos no teste do nado forçado.

Como dito anteriormente, há uma estreita relação entre monoaminas e depressão, e a literatura relata que o sistema dopaminérgico está envolvido na fisiopatologia da mesma (DAILY *et al.*, 2004). De fato, um estudo clínico mostrou que os níveis plasmáticos dos metabólitos de dopamina encontram-se reduzidos em pacientes depressivos, indicando que, nesta patologia ocorre uma metabolização de dopamina (MITANI *et al.*, 2006). Logo, é também verificado o uso de fármacos antidepressivos com ação neste sistema, o que foi confirmado através da potenciação da transmissão dopaminérgica induzida pelo uso de antidepressivos (D'AQUILA *et al.*, 2000). Nossos resultados têm mostrado que no teste do nado forçado, a redução do tempo de imobilidade causada por *Hoodia gordonii* foi revertida com a pré administração de SCH23390 (antagonista dopaminérgico D₁), bem como pela administração de sulpirida (antagonista do receptor dopaminérgico D₂), sugerindo que este efeito antidepressivo está relacionado de alguma forma com os receptores dopaminérgicos D₁ e D₂. A interação da droga em nossa pesquisa, com o receptores dopaminérgicos podem explicar o efeito do extrato sobre a redução na ingestão alimentar.

Em relação ao efeito antiobesidade, tem sido descrito que os receptores D₂ estão relacionados com a ingestão alimentar. Estudo prévio comprovou que animais com déficit destes receptores no estriado tendem a apresentar um comportamento alimentar compulsivo e uma preferência para alimentos gordurosos (JOHNSON & KENNY, 2009).

È importante destacar que os receptores dopaminérgicos D₂ são expressos em regiões pré e pós sináptica. No teste do nado forçado, no presente trabalho, foi verificado que a sulpirida liga-se aos receptores D₂ pós sinápticos, o que impediu este efeito antidepressor de *H. gordonii*. Por outro lado, se sua ligação fosse a nível pré-sináptico não se observaria provavelmente uma redução do tempo de imobilidade. Sulpirida, antagonista D₂, quando administrado previamente a *H. gordonii* impediu o efeito antidepressivo, o que pode se especular ser uma ação da sulpirida nos receptores pós sinápticos.

Estudo recente mostra que *Hoodia gordonii* quando administrada em mulheres, por 15 dias, aumentou os níveis de pressão arterial e a frequência cardíaca, efeitos estes que podem estar estreitamente relacionados com os receptores noradrenérgicos (BLOM *et al.*, 2011). Vários fármacos usados no tratamento da obesidade apresentam ação no sistema noradrenérgico, dentre eles sibutramina. E anfetaminas, aumentando a concentração sináptica de noradrenalina, ou atuando diretamente nos receptores noradrenérgicos (ELHWEGI, 2004). No presente trabalho, foi demonstrado que *H. gordonii* tem uma ação em nível de sistema noradrenérgico, visto que, a prazosina (antagonista do receptor α 1-adrenérgico) e a ioimbina (antagonista α 2-adrenérgico) reverteram o efeito antidepressivo de *H. gordonii*, indicando que este efeito antidepressivo está de alguma forma relacionado com os receptores α 1 e α 2-adrenérgicos. Interessante que, foi demonstrado que, estes receptores quando ativados promovem uma redução da ingestão calórica (WELLMAN & DAVIES, 1991). E ainda vale ressaltar que, as anfetaminas, fármacos anorexígenos, têm como mecanismo de ação o envolvimento do sistema noradrenérgico. E nosso estudo identificou que, o extrato mostrou bons efeitos antiobesidade e antidepressivo, e estas ações provavelmente estão também relacionadas com o sistema noradrenérgico.

Em uma pesquisa anterior, foi demonstrada que a sibutramina promoveu uma redução na ingestão de comida, e os autores relacionaram este efeito à atividade noradrenérgica central dos receptores α 1-adrenérgicos (JACKSON *et al.*, 1997). Outro estudo identificou uma interação da clonidina, um agonista α 2 adrenérgico, com a ioimbina, antagonista também utilizado neste trabalho. E foi observada uma reversão do efeito antidepressivo da clonidina no teste do nado forçado, mostrando que a interação da clonidina no efeito antidepressivo ocorre pelo receptor pós sináptico (O'NEILL *et al.*, 2001). Da mesma forma, na presente pesquisa, *Hoodia gordonii* reduziu a ingestão de água e comida e foi detectada que a ação deste extrato sofre influência de alterações no sistema noradrenérgico, pois foi identificado

uma reversão do efeito antidepressivo com o pré-tratamento de antagonista α_1 e α_2 (α -adrenoreceptores).

No presente estudo, o envolvimento do sistema serotoninérgico na ação antidepressiva de *H. gordonii* foi investigado através da inibição da síntese de serotonina pelo uso de PCPA, inibidor da enzima triptofano hidroxilase. Estudos anteriores relatam que a administração de PCPA é capaz de depletar os níveis de estoque de serotonina, em torno de 60%, sem afetar os níveis de dopamina e noradrenalina (LUSCOMBE *et al.*, 1993; REDROBE *et al.*, 1998). Estudo prévio demonstrou que PCPA também reverte o efeito antidepressivo de fluoxetina (MACHADO *et al.*, 2007).

Nossos achados mostraram que o efeito antidepressivo de *H. gordonii* no modelo de nado forçado foi revertido pelo pré-tratamento de camundongos com PCPA, sugerindo que este efeito pode ser dependente da viabilidade da transmissão de serotonina. Confirmando estes achados, a literatura mostra de fato que, este neurotransmissor está envolvido em diversos processos fisiopatológicos, e dentre estes destacam-se a depressão e a obesidade. Com relação à obesidade e a serotonina, em um estudo anterior com adolescentes (SOOKOIAN *et al.*, 2007) e adultos jovens (SOOKOIAN *et al.*, 2008) verificou-se uma associação entre polimorfismo dos transportadores de serotonina (SLC6A4) e aumento de peso. Outro estudo descreveu que o aumento da liberação de serotonina promove a hipofagia, e a inibição da liberação causa hiperfagia (ARONNE & THOMTON-JONES, 2007). Outros pesquisadores demonstraram que níveis reduzidos ou alterações na transmissão de 5HT estão relacionados com aumento do peso e do desejo de consumir doces, alimentos calóricos e palatáveis (NAVES & PASCHOAL, 2007).

Em relação aos receptores serotoninérgicos envolvidos com o efeito antidepressor destaca-se o receptor 5-HT_{1A}, que participa do tratamento da depressão e da ansiedade (SARGENT *et al.*, 2000; BLIER & WARD, 2003). Foi possível verificar que a administração de agonista 5HT_{1A} reduziu o tempo de imobilidade dos animais, no teste do nado forçado (SINGH & LUCKI, 1993). Estão localizados a nível pré-sináptico no núcleo da rafe e pós-sináptico no sistema límbico e cortical (CELADA *et al.*, 2004). Estudo prévio realizou o pré tratamento com NAN-190, seguido de metanfetamina e houve uma redução da atividade locomotora do animal (GINAWI, AL-MAJED & AL-SUWAILEN, 2005a). Até o presente momento não há relatos na literatura de antagonistas serotoninérgicos para o extrato *Hoodia gordonii*, e nossos dados mostraram que a pré-administração de NAN-190 reverteu o efeito

antidepressor/estimulante de *H. gordonii* no teste do nado forçado, mostrando uma relação deste receptor com o extrato.

A serotonina influi sobre inúmeras funções cerebrais, estimulando ou inibindo o ácido gama aminobutírico (GABA) (ROSSI & TIRAPEGUI, 2004). Os fármacos que inibem a recaptação deste neurotransmissor promovem uma sensação de saciedade e aumentam o metabolismo basal do animal (FERREIRA & GOMES, 2009; GARFIELD & EISLER, 2009). Os receptores envolvidos neste processo são inúmeros, mas destacam-se os receptores das famílias 5HT₁ e 5HT₂, sobressaindo o 5HT_{2C}, pois animais que não apresentavam este receptor desenvolviam obesidade e convulsões, e o uso de droga agonista favorecia a redução do peso (BICKERDIKE, 2003; WARD *et al.*, 2008).

No presente estudo foi utilizado ritanserina, antagonista receptor 5-HT_{2A/2C} em camundongos, seguido de *H. gordonii* e foi possível identificar uma relação deste receptor com o extrato, através do aumento do tempo de imobilidade. Estes receptores encontram-se em várias regiões cerebrais e estão envolvidas com as desordens do humor (CELADA *et al.*, 2004). Um estudo utilizou a ritanserina e WAY-100635 para investigar a relação com a d-fenfluramina, uma vez que este fármaco estimula a liberação endógena de serotonina e não foi encontrada nenhuma relação com estes antagonistas, ou seja, não foram capazes de alterar o efeito da anfetamina (JAVED *et al.*, 1998). Lorcaserin é um fármaco que se encontra no mercado há pouco tempo para tratar a obesidade, é agonista dos receptores 5HT_{2C} nos neurônios pro-ópiomelanocortina, (POMC) e pode agir também com os receptores 5HT_{2A/2B}, quando administrada em doses maiores (MARTIN *et al.*, 2011).

Os receptores 5HT₃ possuem aproximadamente 70-80% localização pré-sináptica, exceto na região do hipocampo, onde se localizam principalmente no neurônio pós-sináptico (MIQUEL *et al.*, 2002), estão envolvidos com a liberação de outros neurotransmissores como dopamina e acetilcolina. Há relatos mostrando que, a administração aguda de antagonistas destes receptores reduz o tempo de imobilidade no teste do nado forçado (BRAVO & MASWOOD, 2006). O ondansetrom é um antagonista deste receptor e os dados da presente pesquisa mostraram que, o mesmo foi capaz de inibir o efeito anti-imobilidade de *Hoodia gordonii* no teste do nado forçado. Estudo realizado com metanfetamina e ondansetrom foi possível perceber um aumento da ingestão alimentar nos animais que foram pré-tratados com ondansetrom, mostrando o envolvimento deste anorexígeno com o antagonista 5HT₃

(GINAWI, AL-MAJED & AL-SUWAILLEN, 2005b), o que foi verificado também em nosso trabalho.

A sibutramina interage com inúmeros tipos de receptores adrenérgicos e serotoninérgicos, e verificado no estudo de Janhunen *et al.* (2011), que o pré tratamento de animais com prazosina, seguida da administração de sibutramina promoveu um aumento de 20% na ingestão de água, sem alterar a ingestão de comida em relação ao grupo controle. Quando foi utilizado um antagonista seletivo WB4101, houve reversão do efeito da sibutramina na ingestão alimentar. Um antagonista 5HT_{1B} reduziu o efeito de sibutramina em relação à ingestão da primeira refeição após o uso do anorexígeno. Os antagonistas α 2A/D adrenérgicos evidenciaram o efeito da sibutramina em relação à ingestão alimentar, já o antagonista específico BRL44408 não aumentou o efeito anorexígeno da sibutramina. Os receptores α ₂ são receptores pré-sinápticos, em relação ao efeito estimulante, a locomoção do animal foi reduzida com o pré-tratamento de antagonista α ₁, α ₂ e 5HT_{1/2/7} (JANHUNEN *et al.*, 2011).

Percebe-se aqui que os resultados obtidos no teste do nado forçado mostram-se promissores, pois *H. gordonii* interagiu com todos os antagonistas testados de noradrenalina, dopamina e serotonina, o que pode trazer uma ação mais rápida e ser mais eficaz na redução do peso. A literatura tem demonstrado que no tratamento da obesidade existe uma variedade de fármacos que apresentam ligação a mais de um receptor, assim como a sibutramina já citada aqui, que interage com receptores de noradrenalina e serotonina.

Pelos efeitos demonstrados até aqui e no intuito de comparar a sinalização monoaminérgica, a presente pesquisa buscou investigar os níveis de monoaminas e seus metabólitos em corpo estriado de camundongos, através da análise de HPLC. Outras áreas cerebrais não foram possíveis avaliar devido à ocorrência de problemas técnicos.

Neste teste, os dados mostraram que *Hoodia gordonii* na dose de 50 mg/Kg foi capaz de aumentar os níveis de dopamina em corpo estriado de camundongos após 15 dias de tratamento, e os seus metabólitos DOPAC (não foi alterado em nenhum período ou dose) e HVA (foi reduzido após 1 dia na dose de 50mg/kg). A mensuração dos níveis dos metabólitos das catecolaminas dá uma idéia da taxa de liberação e renovação destas catecolaminas no cérebro. Por exemplo, concentrações de HVA no corpo estriado dão idéia de renovação da DA

nesta área cerebral. Concentrações de HVA diminuem, por exemplo, na doença de Parkinson, onde há degeneração de neurônios dopaminérgicos (MACÊDO, 2005).

Visto que DA possui um efeito supressor do apetite e a administração de *H. gordonii* é capaz de aumentar o conteúdo de DA em estriado de ratos, a atividade supressora do apetite apresentada pela *Hoodia gordonii* pode estar, em parte, relacionada com um possível efeito dopaminérgico. Um estudo realizado com a anfetamina em camundongos *Swiss* verificou uma redução nos níveis de DA e DOPAC no estriado após 4 horas de administração do fármaco, o que sugere uma depleção deste neurotransmissor, após o uso de anfetamina (GLUCK *et al.*, 2001).

A dopamina é um neurotransmissor diretamente relacionado à alimentação e os seus efeitos vão depender do tipo de receptor e da sua localização no cérebro. Estudo de imagens do cérebro tem mostrado que, quando ocorre redução do número de receptores dopaminérgicos D₂ há um aumento do índice de obesidade (WANG *et al.*, 2001). Os receptores D₃ também parecem participar e interagir com vários dos principais mensageiros de sinalização (como a insulina, leptina e grelina) na modulação da recompensa e saciedade, obtida através da ingestão de alimentos (THANOS *et al.*, 2008). Nosso estudo mostrou um aumento dos níveis de dopamina após 15 dias de uso do extrato. E a taxa de metabolização do HVA/DA mostrou-se reduzida após 1 dia e do DOPAC/DA após 8 dias na dose de 50mg/kg, evidenciando que pouca monoamina foi metabolizada com o uso do extrato, que pode estar contribuindo para os níveis elevados das monoaminas. E após 15 dias de tratamento, apesar do aumento da concentração de dopamina em corpo estriado de camundongos, houve um aumento significativo da metabolização DOPCA/DA na dose de 25mg/kg.

A sinalização dopaminérgica apresenta ação de supressão do apetite no núcleo arqueado e hipotálamo lateral, enquanto que o hipotálamo ventromedial é capaz de estimular a ingestão de alimentos (RAMOS *et al.*, 2005). Também tem sido sugerido que, a atividade dopaminérgica no córtex pré-frontal é influenciada pelas propriedades sensitivas da comida (GAMARO *et al.*, 2003).

Este neurotransmissor parece regular o apetite pela modulação do sistema de recompensa da comida no circuito mesolímbico no cérebro (STEELE *et al.*, 2010), esta ativação parece estar relacionada com o subtipo de receptor dopaminérgico D₅ (POTHOS *et al.*, 1995). Tratamentos sistêmicos repetidos com agonistas dopaminérgicos D₁ e D₂ são capazes de

produzir redução do consumo de comida (VALASSI; KLIBANSKI & BILLER, 2008).

Em relação à serotonina, os resultados apresentados evidenciaram que a administração de *Hoodia gordonii* em camundongos, aumentou os níveis desta monoamina, em corpo estriado, na dose de 25 e 50 mg/Kg após 1, 8 e 15 dias de tratamento. Já o seu metabólito 5HIAA não sofreu nenhuma alteração significativa, e na taxa de metabolização 5HIAA/5HT houve uma redução após 8 dias de tratamento na dose de 25mg/kg. O extrato de *Chemerim* foi administrado em ratos por 17 dias e foi observado um aumento dos níveis de serotonina e uma redução nos níveis do metabólito e da taxa de metabolização na região do hipotálamo, não promoveu alteração nos níveis de dopamina, nem noradrenalina (BRUNETTI *et al.*, 2014). A administração de metanfetamina por quatro dias foi capaz de reduzir os níveis de serotonina em hipocampo, estriado e córtex, em torno de 60-90% (GLUCK *et al.*, 2001).

Existe uma forte evidência que o aumento na atividade pós-sináptica dos receptores serotoninérgicos tende a causar uma redução na quantidade de alimento ingerido, durante uma refeição e modifica o padrão de alimentação. A mesma evidência existe para o papel anorético da 5-HT, particularmente como resposta às dietas com balanceamento de aminoácidos (FEIJÓ; BERTOLUCI & REIS, 2011).

Em relação à noradrenalina foi encontrado em nossa pesquisa um aumento em ambas as doses após 15 dias de tratamento com *H. gordonii*. Esta monoamina está relacionada com o consumo alimentar, através da ativação dos receptores $\alpha 2$ adrenérgicos, já a estimulação dos receptores $\alpha 1$, $\beta 2$ e $\beta 3$ apresentam um efeito oposto (RAMOS *et al.*, 2005). O mercado farmacêutico investe pesado em pesquisas com as monoaminas, e já foi descoberto que o inibidor da recaptção de noradrenalina GW320659 possui uma atividade antidepressiva, além de ação antiobesidade (HAINER *et al.*, 2006). A Riboxetina, um potente e seletivo inibidor da recaptção de noradrenalina, foi aprovada para o tratamento da depressão maior. Este fármaco ainda não foi testado em pacientes obesos, entretanto, mulheres tratadas com riboxetina tiveram uma significativa redução de peso (LU *et al.*, 2005).

Um estudo experimental com a utilização de sibutramina por 14 dias identificou uma redução dos níveis de monoaminas (dopamina, serotonina, noradrenalina e seus metabólitos) no hipotálamo de animais obesos, comparado com animais que apresentavam peso normal (NAKAGAWA *et al.*, 2000). A fenfluramina, uma anfetamina, em estudo de microdiálise foi

descrito que esta promove uma elevação dos níveis de noradrenalina, dopamina e serotonina em córtex pré-frontal de ratos (ROTHMAN *et al.*, 2003). Outra pesquisa identificou uma redução, em torno de 45-60%, da quantidade de serotonina no cérebro de camundongos, mostrando um efeito tóxico deste fármaco e inibiu completamente a recaptação das monoaminas, e o n-nitrosufenfluramina, um derivado da fenfluramina, inibiu a recaptação de dopamina (20%) e noradrenalina (25%) (SATOH *et al.*, 2006).

Como discutido acima, as monoaminas apresentam um importante papel no controle do apetite. Foi verificado neste estudo que administração de *Hoodia* é capaz de interferir na neurotransmissão noradrenérgica, dopaminérgica e serotoninérgica em corpo estriado de camundongos, promovendo um aumento dos níveis das três monoaminas, após 15 dias, indicando assim que as monoaminas são mediadoras das ações de *H. gordonii*.

O presente estudo investigou os efeitos da *Hoodia gordonii*, um agente anorexígeno de ação central (MACLEAN e LUO, 2004), sobre o estresse oxidativo, em hipocampo de camundongos. Para isso foram utilizados quatro indicadores envolvidos nesse processo: concentração de nitrito, glutathiona reduzida (GSH), atividade da catalase (CAT) e determinação da produção de substâncias ácidas reativas com o ácido tiobarbitúrico (TBARS).

O estresse oxidativo é o resultado da excessiva produção de espécies químicas reativas, como os radicais livres. Vários estudos mostram a correlação entre obesidade e promoção do estresse oxidativo (FAINTUCH *et al.*, 2007). Isso se deve principalmente pelo papel endócrino das células de gordura (adipócitos), que além da sua função de armazenamento, produzem e excretam quantidades significativas de adipocinas. Essas moléculas modulam a ação não somente do tecido adiposo, mas também de vários sistemas orgânicos (HERMSDORFF & MONTEIRO, 2004; MINER, 2004). Pelo fato de haver uma maior secreção de adipocinas pró-inflamatórias, em virtude da quantidade excessiva de tecido adiposo, nos últimos anos a obesidade vem sendo considerada como uma condição inflamatória crônica (VISSER *et al.*, 1999; SEWTER *et al.*, 1999; COTTAM *et al.*, 2003; FAINTUCH *et al.*, 2007). A produção elevada de radicais livres pode gerar danos significativos do DNA, desempenhando um importante papel no processo de mutação e carcinogênese (KEHER, 1993).

O consumo de oxigênio do cérebro resulta em geração de radicais livres. No combate à ação degenerativa dessas moléculas, observou-se a importância do sistema antioxidante (SOD, GPx e CAT) e sua função de evitar o dano celular produzido por radicais livres (DREVER *et al.*, 2012). No presente estudo, não foi verificada nenhuma alteração nos níveis de GSH e CAT nos três tempos (1, 8 e 15 dias), sugerindo que a *H. gordonii*, por si só, não possui ação pró- e nem antioxidante. Nossos resultados não mostraram semelhança aos encontrados em estudo realizado com hepatócitos de ratos, em que foi administrado D-anfetamina, um importante anorexígeno de ação central, e este fármaco reduziu os níveis de GSH em uma relação inversa concentração/dose dependente. Após o isolamento das células hepáticas, essas foram colocadas em meio tamponado e submetidas a doses de anfetamina por 2 horas nas concentrações de 0,2; 0,4; 0,8 e 1,6 mM (EL-TAWIL *et al.*, 2011). Os níveis de GSH celular foram significativamente reduzidos após incubação com todas as concentrações de anfetamina, em todos os intervalos de tempo, comparados com o controle. A depleção de GSH foi máxima aos 120 minutos, após a adição da D-anfetamina. Esses resultados comparativos mostram uma vantagem do extrato de *Hoodia gordonii*, pois este não foi capaz de diminuir a concentração de GSH.

Autores afirmam que o uso crônico de anfetaminas leva a um aumento significativo nos índices de estresse oxidativo, identificado por variações da atividade da CAT no córtex pré-frontal, hipocampo e corpo estriado de ratos (FREY *et al.*, 2006), após tratamento agudo (dose única) e dose repetida (tratamento por 7 dias) com anfetamina nas doses de 1mg/kg, 2 mg/kg e 4 mg/kg. Os autores observaram que a exposição repetida a anfetamina induz um aumento da atividade da SOD no hipocampo dos animais, nas três doses estudadas e que a anfetamina administrada de forma crônica (durante 7 dias) leva a uma diminuição na atividade da CAT nas doses de 1 mg/kg e 2 mg/kg e um aumento dessa atividade na dose de 4 mg/kg (FREY *et al.*, 2006). Outro estudo utilizando concentrações de 4 x 10 mg / kg, concluiu que a exposição de camundongos à metanfetamina diminuiu a atividade da CAT na região do estriado (JAYANTHI *et al.*, 1998).

Usando uma metodologia diferente (20 mg/kg durante 14 dias), Carvalho *et al.* (2001) demonstraram que a atividade da CAT mostra-se aumentada no córtex pré-frontal de ratos *Wistar*. Por outro lado, D' Almeida e seus colaboradores (1995) não encontraram nenhuma mudança na atividade da CAT, após o tratamento crônico com metanfetamina (2,5 mg/kg durante 5 meses), em ratos *Wistar*. As diferenças metodológicas utilizadas para avaliar a

interferência de anoroxígenos de ação central sobre a atividade da catalase, em modelos animais, tornam difícil inferir conclusões mais específicas e, portanto, mais estudos são necessários para esclarecer a importância destas alterações.

É válido salientar que todos os componentes da célula são suscetíveis à ação das ERO's, porém a membrana é uma das mais atingidas em decorrência da peroxidação lipídica, que acarreta alterações na sua estrutura e permeabilidade (VAN DER KRAAIJ *et al.*, 1988). Conseqüentemente ocorre uma perda da seletividade na troca iônica e liberação do conteúdo de organelas, como as enzimas hidrolíticas dos lisossomas, e formação de produtos citotóxicos (como o malonildialdeído - MDA), resultando em morte celular (HERSHKO, 1989). A lipoperoxidação também pode estar associada aos mecanismos de envelhecimento, de câncer e à exacerbação da toxicidade de xenobióticos (SHAN; AW & JONES, 1990). Assim, como na formação das ERO's, nem sempre os processos de lipoperoxidação são prejudiciais, pois seus produtos são importantes na reação em cascata a partir do ácido araquidônico (formação de prostaglandinas) e, portanto, na resposta inflamatória (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1990). Logo, o excesso de tais produtos pode ser lesivo (ROSS & MOLDEUS, 1991).

A concentração plasmática de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) liberadas durante a peroxidação lipídica está diretamente ligada ao IMC (Índice de massa corpórea), mostrando que o acúmulo excessivo de tecido adiposo pode levar a um aumento na produção de espécies reativas (FURUKAWA *et al.*, 2004). Estudo prévio relacionando a obesidade com o estresse oxidativo verificou que a concentração de TBARS foi mais elevada nas obesas hipertensas e menor nas não obesas normotensas (KONUKOGLU *et al.*, 2003).

A metanfetamina é capaz de causar estresse oxidativo em tecido cerebral. Um estudo mostrou que a metanfetamina foi administrada por quatro dias aos animais e foi verificado um aumento do dano oxidativo, ocasionado pelo aumento de malonildialdeído na região do hipocampo e estriado de animais (GLUCK *et al.*, 2001).

O presente estudo, não identificou variações significativas no TBARS. Os valores de MDA nos grupos de 25 mg/kg e 50 mg/kg, comparados ao grupo controle não mostraram grandes diferenças. Diferenças foram encontradas em uma pesquisa que mostrou aumento da produção de TBARS em hepatócitos de ratos, tratados com D-anfetamina, em comparação

com controle (animais não tratados). O experimento de tempo-concentração de D-anfetamina (0,4, 0,8 e 1,6 mM) resultou em um aumento significativo na produção de TBARS nos hepatócitos (EL-TAWIL *et al.*, 2011). A administração de fenfluramina a hepatócitos de ratos causou um aumento dos níveis de MDA e uma redução da viabilidade celular, acompanhado da perda de ATP intracelular (NAKAGAWA *et al.*, 2005).

Pelo que foi encontrado no presente estudo, *H. gordonii* apresenta-se favorável, ou seja, não mostrou desencadear o surgimento de espécies reativas de oxigênio nos experimentos realizados.

Sabe-se que o NO desempenha um importante papel em praticamente todos os sistemas do organismo (EISERICH; PATEL & O'DONNELL, 1998). Embora exerça diversas funções fisiológicas úteis, quando em excesso, o NO pode exercer efeitos nocivos. Em determinadas condições, o NO e o O₂⁻ podem interagir, resultando na formação de peroxinitrito (ONOO⁻), um produto extremamente tóxico. Esse composto é capaz de reagir com diversas moléculas: proteínas, lipídeos, carboidratos e ácidos nucleicos, danificando-as (TUTKA *et al.*, 2007). Além disso, seus prováveis produtos de decomposição, o radical OH⁻ e o dióxido de nitrogênio, dentre outros, têm semelhante potencial deletério (RADENOVIC *et al.*, 2003).

Neste estudo, o tratamento com *H. gordonii* em camundongos, causou uma redução significativa nos níveis de nitrito, quando comparado com o grupo controle, nos três tempos de tratamento. Os níveis de nitrito foram quantificados como forma indireta de determinar os níveis de óxido nítrico, sintetizados após a exposição a *H. gordonii*. A diminuição do conteúdo de nitrito/nitrato no hipocampo pode estar relacionada com a degradação de peroxinitritos. *Hoodia gordonii*, nesse modelo, apresentou atividade antioxidante, diminuindo a formação de nitrito, contribuindo, dessa maneira, para a redução de ERO's cerebral. A diminuição da concentração de nitrito cerebral sugere um efeito neuroprotetor da *H. gordonii*.

Anfetaminas foram utilizadas por diversos autores (JAYANTHI *et al.*, 1998; FREY *et al.*, 2006; EL-TAWIL *et al.*, 2011) e verificou-se que estes fármacos promovem um aumento do estresse oxidativo nos experimentos realizados, como por exemplo, um estudo que utilizou a anfetamina por quatro dias em ratos, encontrou um aumento da SOD na região do hipotálamo (KUO *et al.*, 2009).

O chá verde, bastante utilizado pela população brasileira para reduzir o peso, foi administrado em camundongos por três semanas e foi verificado que promoveu uma redução do estresse oxidativo no fígado de animais, promovendo uma aumento da catalase, glutathione peroxidase (Gpx3), glutaredoxin (Grx2), GSR e glutathione S-transferases (GSTa1, GSTa4, GSTm1, GSTm2 and GSTm3), o que não foi encontrado no grupo controle (NEWSOME *et al.*, 2014).

Hoodia gordonii é bastante comercializada fora do Brasil, como fármaco anorexígeno e há poucos relatos de pesquisa sobre este extrato, neste sentido despertou-se o interesse em analisar os parâmetros bioquímicos de ratos após a administração de *Hoodia gordonii*. A determinação dos parâmetros bioquímicos no sangue é uma ferramenta para auxiliar o diagnóstico de doenças metabólicas, definir o perfil nutricional de uma população homogênea e permitir uma avaliação clínica mais aprofundada de indivíduos. Desta forma, o presente estudo buscou investigar os efeitos da administração de *Hoodia gordonii* nos níveis glicêmicos, bem como os níveis de colesterol total e triglicerídeos e marcadores de lesão hepática (TGO, TGP) em ratos.

As alterações metabólicas relacionadas com a nutrição apresentam cada vez um impacto maior na saúde humana e estão relacionadas com doenças de elevado índice de morbidade e mortalidade no mundo ocidental, tais como doenças cardiovasculares, diabetes, doenças neurodegenerativas, entre outras. Em indivíduos com sobrepeso e obesidade, um excesso de ácidos graxos livres (AGL) provenientes da lipólise (sobretudo do tecido adiposo abdominal) pode afetar o metabolismo lipídico hepático, estimulando a produção hepática de lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL-colesterol) ricas em triglicérides, levando a um aumento de lipoproteínas de baixa densidade (LDL-colesterol) e a uma redução nas lipoproteínas de alta densidade (HDL-colesterol). Desta forma, altos níveis de AGL podem ter um impacto substancial no risco cardiometabólico, promovendo tanto dislipidemia quanto resistência à insulina. A redução de peso provocada por muitos dos anorexígenos disponíveis é normalmente acompanhada de melhoras significativas nas comorbidades clínicas, incluindo efeitos favoráveis sobre o perfil lipídico e melhora no metabolismo da glicose (HAZENBERG, 2000; MAGKOS *et al.*, 2008). Desta forma, o presente estudo objetivou realizar o perfil lipídico e glicêmico dos animais antes e após o tratamento com *H. gordonii*.

Como referido anteriormente, apesar de diversas espécies vegetais apresentarem baixa toxicidade, existe um número cada vez maior de estudos científicos que comprovam a toxicidade de plantas antes usadas sem restrições e de forma indiscriminada. Espécies como a kava-kava (*Piper methysticum* G. Forst, Piperaceae) foram responsáveis por dezenas de casos de hepatotoxicidade na Europa (WHITTON *et al.*, 2003; CLOUATRE, 2004). No Brasil, na década de 80, o confrei (*Symphytum officinale* L. Boraginaceae) foi disseminado como planta para a cura de diversas doenças, inclusive o câncer. Estudo comprova sua ação cicatrizante, quando usada de forma tópica, entretanto, o uso interno desta planta, como por exemplo, em saladas, leva a um sério risco, pois é altamente hepatotóxica devido aos alcalóides pirrolizidínicos (STICKEL & SEITZ, 2000).

Os resultados do presente estudo mostraram que alguns parâmetros bioquímicos (glicose, TGO, TGP, triglicérides e colesterol) dos animais tratados com *Hoodia gordonii* apresentaram-se alterados em relação ao grupo controle, entretanto, a literatura retrata que os valores considerados dentro da faixa de normalidade podem variar, de acordo com estudo realizado por Dantas *et al.* (2006), descreveram alguns valores bioquímicos considerados como referência para ratos (200-220g), dentre estes valores encontraram glicose sanguínea $108 \pm 17,4$ mg/dL; AST $81 \pm 11,7$ U/L; ALT $51 \pm 12,3$ U/L; colesterol total $87 \pm 18,1$ mg/dL e triglicérides $82 \pm 24,7$. Pode-se considerar que de acordo com o estudo citado, nossos resultados encontram-se com valores bem próximos a normalidade para este animal.

Uma pesquisa experimental realizada na China comparou ratos *Wistar* convencionais com animais que nunca tiveram contato com patógenos, ou seja, livre de microorganismos, e foi observado que os ratos convencionais apresentam valores bioquímicos acima (ALT, AST, glicose sanguínea e outros) que o outro grupo (XIAO *et al.*, 2004). Outro estudo considerou os valores para ratos de AST entre 54 a 269 UI/L, e ALT 26 a 77 UI/L (BIRCHARD & SHERDING, 1998). Alanina aminotransferase e aspartato aminotransferase são transaminases encontradas em vários tecidos no indivíduo. Usualmente estas enzimas estão aumentadas na corrente sanguínea quando ocorre algum dano hepático, entretanto estas enzimas não são específicas de injúria nos hepatócitos (GALLIERI *et al.*, 2006). Um estudo randomizado realizado em mulheres acima do peso tratadas com *Hoodia gordonii* por 15 dias não apresentou alterações dos níveis de ALT quando comparados ao controle (BLOM *et al.*, 2012). Nossos resultados mostraram que TGP na dose de 50mg/kg após 08 dias e 15 dias

houve um aumento considerado significativo e os níveis de TGO na dose de 25mg/kg após 1 dia de tratamento apresentou uma redução, resultado similar ocorreu na dose de 50mg/kg após 8 e 15 dias. O uso de *Hoodia gordonii* por 1 dia, não é suficiente, nas doses utilizadas de interferir com a função hepática. Estas transaminases, apesar de estarem aumentadas não foi verificada lesão hepática na análise histológica.

Estudo clínico com mulheres obesas utilizou a sibutramina, orlistat e metformina em grupos diferentes, por seis meses e promoveu uma redução nos níveis de colesterol total, colesterol de baixa densidade, triglicérides e apolipoproteína B, e nestes grupos não houve alteração nos níveis do colesterol de alta densidade (GOKCEL *et al.*, 2002). Mulheres obesas que usaram o chá verde por 12 semanas apresentaram uma redução nos níveis de triglicérides e colesterol de baixa densidade e um aumento nos níveis do colesterol de alta densidade (HSU *et al.*, 2008).

Neste estudo, *Hoodia gordonii* alterou os níveis de glicose sanguínea em ambas as doses após 1, 8 e 15 dias de tratamento, em ambas as doses, exceto na dose de 25mg/kg após 15 dias. Estes aumentos na glicose podem ser relacionados a ingredientes presentes no extrato, como os glicosídeos. Entretanto, valores glicêmicos diferentes foram encontrados por RUBIN, CAWTHORNE & BINDRA (2002), que identificaram em seu trabalho uma atividade anti-diabética da *Hoodia gordonii* utilizada em ratos. Pelo que foi exposto acima, as pesquisas revelam que os valores bioquímicos podem variar com o uso de substâncias anorexígenas, sejam elas oriundas ou não de plantas naturais, mas estas alterações não obrigatoriamente podem indicar algum prejuízo ao organismo.

Em relação aos valores de colesterol total foi identificado um aumento na dose de 50mg/kg após 8 dias e na dose de 25mg/kg após 15 dias. Já os valores de triglicérides mostraram-se reduzidos após 1 dia em ambas as doses. As investigações apontam que a redução dos níveis plasmáticos de colesterol total e particularmente, da fração LDL, seja através de modificações no estilo de vida, ou o uso de medicamentos, têm se mostrado eficaz para a diminuição de eventos coronarianos, normalização da função endotelial, estabilização e até mesmo, regressão de lesões ateroscleróticas (GONÇALVES *et al.*, 2006). Os valores bioquímicos encontrados neste estudo não mostraram uma relação com dose, ou período de tratamento, logo outros exames séricos precisam ser realizados.

A avaliação da toxicidade é realizada para determinar o potencial de novas substâncias e produtos que podem causar prejuízos à saúde humana. A determinação da toxicidade aguda de uma substância é extremamente importante, pois a população faz muitas vezes o uso da forma indevida de produtos naturais, partindo de uma visão que não traz nenhum malefício à saúde. Desta forma, camundongos foram tratados uma única vez com *Hoodia gordonii*, via oral, na dose de 550 e 2000mg/kg, e outro grupo foi tratado com salina. Em seguida, os animais foram observados logo após a administração, 15, 30 e 60 minutos e os grupos tratados com *H. gordonii* apresentaram alguns sinais gerais de toxicidade: piloereção (mais frequente) e *rearing*, estes comportamentos encontravam-se reduzidos após 60 minutos de administração da droga. Os animais foram pesados e observados por 14 dias consecutivos e não foi verificada neste período nenhuma mortalidade nos grupos.

Estudo prévio realizado com o mesmo extrato na dose de 50mg/kg em ratas gestantes por 13 dias, dose esta também utilizada por nós, não causou nenhum evento adverso e nem malformação, ou anomalias em fetos (DENT *et al.*, 2012). Em relação aos sinais de toxicidade, um estudo detectou como mudança comportamental dos animais com piloereção e prostração, após tratamento com extrato alcoólico de *Jathropa gossypifolia L* (dose maior que 1.800mg/kg) (MARIZ *et al.*, 2006).

A sibutramina apresenta como efeitos adversos a palpitação, constipação, cefaléia, insônia e ansiedade em doses terapêuticas. Uma dose mais elevada pode induzir alterações mentais, hiperatividade do sistema autonômico e alterações neuromusculares, aumento da salivação, elevação da pressão arterial, midríase e convulsões epilêpticas causadas pela síndrome serotoninérgica foi identificada (BOYER & SHANON, 2005; FLORENTIN; LIBEROPOULOS & ELISAF, 2008).

Após 14 dias de observação, os camundongos foram sacrificados e fígado, rim e cérebro (hipocampo) foram removidos e encaminhados para análise histopatológica, na qual não foi verificada nenhuma alteração de fígado e rim nos grupos tratados com *H. gordonii* em comparação ao controle, apesar de ter sido encontrado alterações séricas de TGO e TGP, em outro teste. A área do hipocampo apresentou alterações que foram classificadas em escores: dose 550 (escore 2: 2-2) e 2000 mg/kg (escore 2.5: 2-3), de acordo com Gilat *et al.* (2005). Estas doses foram administradas uma única vez e a dose de 2000 mg/kg foi capaz de promover alterações no hipotálamo, já outros órgãos não foram afetados (fígado e rim). Estudo realizado

em nosso laboratório com monocrotalina (doses 10 e 100mg/kg), um alcalóide que causa hepatotoxicidade em animais e humanos, identificou uma desorganização estrutural na região do hipocampo e córtex parahipocampal de camundongos (HONÓRIO Jr *et al.*, 2012).

Foram escolhidas estas áreas, pois é sabido que o fígado e o rim estão envolvidos no processo de metabolização e excreção de fármacos, e o hipocampo, por ser uma área que foi bastante explorada em nosso estudo. Uma pesquisa que avaliou a biodisponibilidade de P57 administrada em camundongos fêmeas identificou que sua distribuição foi maior no rim, seguida do fígado e cérebro e que foi eliminado do organismo após 4 horas de administração (MAGDULA *et al.*, 2010).

O teste de toxicidade, como mostrado anteriormente, identificou alterações significativas no hipocampo de camundongos. Na tentativa de pesquisar outras possíveis alterações celulares foi investigado o DNA de linfócitos após o uso de *Hoodia gordonii*. Sabe-se que o DNA passa por diversas alterações denominadas de mutações, que na maioria das vezes ocorrem devido aos erros durante o processo de replicação do DNA, na divisão celular. Estas mutações são comuns em todos os seres vivos, e o organismo deve fazer esta reparação de maneira fisiológica. Entretanto, algumas mutações não são corrigidas e podem causar a morte celular. Os agentes mutagênicos são aqueles que alteram a sequência de bases do DNA, causando um aumento na quantidade de mutações. Estes agentes são inúmeros, podem ser endógenos (óxido nítrico, radicais livres de oxigênio), ocupacionais, dietéticos, radiação, poluição e biológico (RIBEIRO & MARQUES, 2003).

A literatura revela que algumas plantas podem produzir substâncias tóxicas, que têm a função de defesa contra vírus, bactérias, fungos e animais predadores (FONSECA & PEREIRA, 2004). E algumas dessas moléculas, derivadas de plantas medicinais são capazes de induzir modificações celulares citotóxicas, entre elas modificações químicas no DNA, as quais podem ser nocivas às células, pois interferem em processos vitais, como a duplicação do DNA e a transcrição gênica, bem como podem comprometer a estrutura do DNA, promovendo lesões gênicas e cromossômicas (TAYLOR *et al.*, 2003; VERSCHAEVE *et al.*, 2004). E poucos são os estudos que analisam a citotoxicidade e genotoxicidade de drogas vegetais, logo são poucas as informações sobre esse assunto (LOHMAN *et al.*, 2001).

Diante disso, a presente pesquisa avaliou a viabilidade celular e a lesão no DNA de linfócitos humano expostos ao extrato de *Hoodia gordonii*, por meio do teste MTT e do teste cometa, respectivamente.

Primeiramente, foi avaliado o potencial citotóxico de *Hoodia gordonii* em linfócitos humanos através do ensaio do MTT, após 24h e 72h de exposição. Estudos de “screening” utilizando MTT tem sido uma ferramenta essencial e eficaz para avaliar o potencial citotóxico de substâncias (ALLEY et al., 1988). Neste teste, o parâmetro utilizado é a viabilidade celular, que é determinada pela atividade de enzimas mitocondriais. Autores relatam que os ensaios de citotoxicidade *in vitro* são reprodutíveis, rápidos, baratos e podem analisar inúmeros compostos de uma só vez, e apesar de não permitirem identificar o mecanismo de ação dos compostos, são os primeiros testes realizados para identificar novos compostos com potencial anticâncer (BERRIDGE et al., 1996; TAKIMOTO, 2003).

Os resultados mostraram que, após os tempos de incubação testados (24 h e 72 h), a *H. gordonii* não foi citotóxica na dose de 200µg/ml, ou seja, as células mostraram-se viáveis mesmo após 72h expostas ao composto de *H. gordonii*, em uma dose considerada relativamente alta para os potenciais fármacos antioncogênicos. Um resultado diferente foi encontrado com anfetaminas, no estudo realizado por EL-TAWIL et al. (2011), em que mostrou citotoxicidade para hepatócitos de ratos após exposição a D-anfetaminas em diferentes concentrações (0,4, 0,8 e 1,6 mM), mostrando um decréscimo significativo na viabilidade celular. As variações na viabilidade celular foram percebidas logo após 30 min de incubação nas doses de 0,4, 0,8 e 1,6 mM e atingiu a citotoxicidade máxima a 120 min, nas mesmas doses.

O teste do cometa não detecta mutações em nível gênico, mas pode ser aplicado ao estudo de lesões genômicas. Estas lesões, a depender de sua natureza, podem ser reparadas mediante expressão de vários genes envolvidos nos mais variados mecanismos de reparo do DNA (SLUPPHAUG; KAVLI & KROKAN, 2003). O ensaio avalia o dano ao DNA de células simples, baseado na migração do DNA desnaturado em um campo eletroforético (OSTLING & JOHANSON 1984).

Sabe-se que os radicais livres possuem a capacidade de interagir com o DNA, induzindo quebras nas fitas do material genético (HALLIWELL & ARUOMA, 1991; TAN,

GROLLMAN & SHIBUTANI, 1999; SALMON *et al.*, 2004; ROWE, DEGTYAREVA & DOETSCH 2008). O ensaio do cometa mostra-se capaz de detectar tanto quebras de fitas simples quanto de dupla fita (CAVALCANTI *et al.*, 2006). As quebras de dupla fita da molécula de DNA são lesões difíceis de serem reparadas, podendo desencadear a morte celular ou mutações deletérias, além disso, as quebras de fitas simples podem ser convertidas em quebras duplas durante o progresso da forquilha de replicação (KHANNA & JACKSON, 2001; KUZMINOV, 2001). É um teste rápido e pouco dispendioso para avaliar danos causados ao DNA devido sua alta sensibilidade (LEE & STEINERT, 2003).

De acordo com a análise dos resultados do ensaio cometa, foi observado que o índice de dano (ID) apresentado pelo grupo tratado com RPMI (controle negativo) foi semelhante aos grupos tratados com *H. gordonii*. Os resultados comparativos com o grupo tratado com doxorrubicina (Doxo) mostram a diferença significativa dos resultados de ID dos diferentes grupos. Em resumo, os resultados obtidos revelam que não houve danos no DNA de linfócitos humanos, induzidos pela *Hoodia gordonii*. Esses resultados corroboram com os estudos realizados no Toxicology Center S.p.A. em Roma (SCOTT *et al.*, 2011), em que experimentos *in vitro* e *in vivo* feitos com *H. gordonii* não mostraram potenciais efeitos genotóxicos do extrato da planta. O extrato demonstrou não ser genotóxico em ensaio de mutação bacteriana *in vitro*, ensaio de mutação genética *in vitro*, utilizando células de linfoma do rato e em um ensaio de medula óssea no rato *in vivo*. Estes dados indicam que o risco genotóxico do extrato de *H. gordonii* é baixo.

Nossos resultados mostraram que *Hoodia gordonii* (50, 100 e 200 µg/mL) foi adicionada aos linfócitos humanos por 24 horas e não causou nenhum dano ao DNA. Doxorrubicina foi utilizada como padrão positivo e destruiu o DNA da célula. Estudo usando drogas anorexígenas como a sibutramina e fenproporex em camundongos mostrou que estas drogas aumentam a frequência de genotoxicidade em todas as doses utilizadas 10, 20 e 40mg/kg (SILVA *et al.*, 2010). *Hoodia gordonii* não causou genotoxicidade, mesmo quando usada em altas doses.

No presente estudo, o índice de dano no teste do ensaio cometa foi realizado por operador manual. Autores comparam o sistema manual e o semi-automático e confirmaram que um operador treinado consegue visualizar melhor os escores do que o processo semi-

automático e automático, porque na análise manual é mais fácil detectar todas as alterações no DNA (AZQUETA *et al.*, 2011).

A literatura recomenda que o medicamento mais adequado para o tratamento da obesidade deve possuir as seguintes características: reduzir o peso corporal e promover uma melhora das doenças dependentes do excesso de peso; ter efeitos colaterais toleráveis e/ou transitórios; não ter propriedades de adição, ou seja, relacionada à dependência; apresentar eficácia e segurança mantidas em longo prazo; possuir mecanismo de ação conhecido; e um custo acessível (GUY-GRAND *et al.*, 1989). Pelo que foi exposto na presente pesquisa, *Hoodia gordonii* mostrou resultados promissores e, apresenta-se como um potencial farmacológico para ser utilizado futuramente no tratamento do sobrepeso e obesidade.

7. CONCLUSÃO

A administração de *Hoodia gordonii* em roedores durante 15 dias desencadeou os seguintes efeitos farmacológicos:

Redução do peso corporal, bem como da ingestão de água e comida durante o tratamento, que pode estar relacionado com a interação do sistema monoaminérgico, pois foi verificada uma interação com os antagonistas e um aumento de monoaminas em corpo estriado;

Possível efeito ansiogênico no teste do labirinto em cruz elevado, após tratamento de 01, 08 e 15 dias, o que foi verificado com a redução dos parâmetros nos braços abertos;

No teste do campo aberto, promoveu redução da atividade *grooming* nos três tempos de tratamento, *rearing* e redução da atividade locomotora no 15º dia, mostrando que o efeito ansiogênico não está relacionado com a redução da atividade locomotora, pois só ocorreu alteração da locomoção após 15 dias de uso e no teste do labirinto em cruz elevado a redução nos parâmetros foram em todos os tempos de tratamento;

Possível efeito antidepressivo no teste do nado forçado, devido à redução no tempo de imobilidade após 01, 08 e 15 dias, que pode estar relacionado com a elevação das monoaminas;

Interação com receptores noradrenérgicos, pela reversão do efeito antidepressor no pré-tratamento com antagonistas (α_1 e α_2);

Interação com receptores dopaminérgicos, pela reversão do efeito antidepressor no pré-tratamento com antagonistas (D_1 e D_2);

Interação com receptores serotoninérgicos, pela reversão dos efeitos no pré-tratamento com antagonistas ($5HT_{1A}$, $5HT_{2A/2C}$, $5HT_{3A}$);

Houve um aumento dos níveis de noradrenalina e serotonina em corpo estriado de camundongos, após 1 dia, e aumento das monoaminas dopamina, noradrenalina e serotonina,

após 15 dias, e redução do metabólito de dopamina (HVA) após 1 dia. E a taxa de metabolização apresentou-se reduzida (HVA/DA – 1d, DOPAC/ DA – 8d, na dose de 50mg/kg, 5HIAA/5HT- 8d, na dose de 25mg/kg) e um aumento após 15 dias DOPAC/DA- 15d;

Em relação ao estresse oxidativo, não foi capaz de alterar os níveis de malonildialdeído (MDA), da enzima catalase, da glutathiona reduzida em hipocampo de camundongos. Entretanto, reduziu a concentração de nitrito em ambas as doses utilizadas, nos três tempos de tratamento.

Não desencadeou alterações histopatológicas hepáticas e renais após administração de doses 550 e 2000mg/kg;

Não foi capaz de danificar o DNA celular de linfócitos humanos, nem promoveu citotoxicidade;

Desta forma, nossos achados apontam um possível uso de *H. gordonii* no tratamento do sobrepeso e obesidade, uma vez que mostrou reduzir o peso corporal e ingestão alimentar, não causar danos em órgãos vitais, como fígado e rim. Foi verificado uma interação da *H. gordonni* com as monoaminas, pois promoveu um aumento na concentração destas e um envolvimento com os antagonistas.

Sabe-se que estes resultados não são suficientes para considerar o extrato devidamente adequado, outras pesquisas experimentais (neuroquímicas, toxicológicas, metabólicas) são necessárias para que possa comprovar a sua eficácia e segurança e possivelmente no futuro trazer benefícios à sociedade que hoje apresenta inúmeras morbidades relacionadas com alterações desencadeadas no sistema monoaminérgico.

REFERÊNCIAS

ABRAHAMSE, S.L.; POVEY K.J.; REES, D.D. Appetite suppressant composition. **US Patent Application**, 2007/0207227 2007.

AHLBERG, A.C. et al. Depression and anxiety symptoms in relation to anthropometry and metabolism in men. **Psychiatry Research**, v.112, n.2, p.101-110, 2002.

ANDRADE, A.; BOSI, M.L.M. Mídia e subjetividade: impacto no comportamento alimentar feminino. **Revista de Nutrição**, v. 16, n. 01, p. 117-125, 2003.

ANVISA. Resolução- **RDC** nº 423, de 14 de fevereiro de 2007.

ANVISA. Resolução - **RDC** nº 424, de 15 de fevereiro de 2007.

ARCHER, J. Tests for emotionality in rats and mice. A review. **Animal Behavior**, v.21, p. 205-235, 1973.

ARCHER, R.; VICTOR, J. *Hoodia* Pilífera subs. *Pillansii*. **Curtis's Botanical Magazine**, v. 4, p. 219-224, 2003.

ARONNE, L.J.; THORNTON-JONES, Z.D. New targets for obesity pharmacotherapy. **Clinical Pharmacology and Therapeutics**, v.81, p.748-752, 2007.

AVULA, B.; WANG, Y.H.; PAWAR, R.S.; SHUKLA, Y.J.; SCHANEBERG, B.; KHAN, I.A. Determination of the appetite suppressant P57 in *Hoodia gordonii* plant extracts and dietary supplements by liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry (LC-MSD-TOF) and LC-UV methods. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, v. 89, p. 606-611, 2006.

AZQUETA, A. et al. The influence of scoring method on variability in results obtained with the comet assay. **Mutagenesis**, v.26, p. 393-399, 2011.

BARBOSA, P.R. et al. The aqueous extracts of *Passiflora alata* and *Passiflora edulis* reduce anxiety-related behaviors without affecting memory process in rats. **Journal of Medicinal Food**, v.11, n.2, p.282-288, 2008.

BARNARD, N.D. et al. D2 dopamine receptor Taq1A polymorphism, body weight, and dietary intake in type 2 diabetes. **Nutrition**, v.25, n.1, p.58-65, 2009.

BARROS, H.M.; TANNHAUSER, S.L.; TANNHAUSER, A.L.; TANNHAUSER, M. The effects of GABAergic drugs on grooming behavior in open field. **Pharmacology and Toxicology**, v. 74, p. 339-344, 1994.

BASSO, A.M.; BRATCHER, N.A.; HARRIS, R.R.; JARVIS, M.F.; DECKER, M.W.; RUEYER, L.E. Behavioral profile of P2X7 receptor knockout mice in animal models of depression and anxiety: relevance for neuropsychiatric disorders. **Behavioural Brain Research**, v.198, n.1, p.83-90, 2009.

BICKERDIKE, M.J. 5-HT_{2C} Receptor Agonists as Potential Drugs for the Treatment of Obesity. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v.3, p.885- 897, 2003.

BIRCHARD, S.J.; SHERDING, R.G. **Saunders Manual of small animal clinic**. São Paulo, Roca, 1998.

BLIER, P.; WARD, N.M. Is there a role for 5-HT_{1A} agonists in the treatment of depression? **Biology Psychiatry**, v.53, n.3, p.193-203, 2003.

BLOM, W.A.M. et al. Effects of 15-d repeated consumption of *Hoodia gordonii* purified extract on safety, ad libitum energy intake, and body weight in healthy, overweight women: a randomized controlled trial. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 94, p.1171–1181, 2011.

BOROWSKY, B. et al. Antidepressant, anxiolytic and anorectic effects of a melanin-concentrating hormone-1 receptor antagonist. **Nature Medicine**, v.8, n.8, 2002.

BOSTWICK, J.M.; BROWN, T.M. A toxic reaction from combining fluoxetine and phentermine. **Journal of Clinical Psychopharmacology**, v.16, p.189-190, 1996.

BOYER, E.W.; SHANNON, M. The serotonin syndrome. **The New England Journal of Medicine**, v.352, p.1112–1120, 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância de Doenças e Agravos não Transmissíveis e Promoção de Saúde. **Vigitel Brasil 2012: vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico** /Ministério da Saúde. Brasília: Ministério da Saúde, 2013.

BRAVO, G.; MASWOOD, S. Acute treatment with 5-HT₃ receptor antagonist, tropisetron, reduces immobility in intact female rats exposed to the forced swim test. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v.85, n.2, p.362-368, 2006.

BRAY, G.A.; GREENWAY, F.L. Current and potential drugs for treatment of obesity. **Endocrinology Review**, v. 20, p. 805-875, 1999.

BRAY, G.A., Medical consequences of obesity. The **Journal of Clinical Endocrinology Metabolism**, v.89, p.2583–2589, 2004.

BRUNETTI, L. et al. Peripheral chemerin administration modulates hypothalamic control of feeding. **Peptides**, v.51, p. 115– 121, 2014.

BRUYNS, P.V. **Stapeliads of Southern Africa and Madagascar**, vol 1. Umdaus Press, Pretoria, pp. 4–8, 2005.

BURKE, R. E.; GREENBAUM, D. Effect of post-mortem factors on muscarinic receptor subtypes in rat brain. **Journal of Neurochemistry**, v.49, p. 529–596, 1987.

BUSH, D.E.; VACCARINO, F.J. Individual differences in elevated plus-maze exploration predicted progressive-ratio cocaine self-administration break points in Wistar rats. **Psychopharmacology** (Berl), v.194, n.2, p.211-219, 2007.

CAGNIARD, B.; BEELER, J.A.; BRITT, J.P.; MCGEHEE, D.S.; MARINELLI, M.; ZHUANG, X. Dopamine scales performance in the absence of new learning. **Neuron.**, v.51, n.5, p.:541-547, 2006.

CARVALHO, F. et al Adaptative response of antioxidant enzymes in different areas of rat brain after repeated d-amphetamine administration. **Addiction Biology**, v.6, p.213–221, 2001.

CAVALCANTI, B.C. et al. Genotoxicity evaluation of kaurenoic acid, a bioactive diterpenoid present in Copaiba oil. **Food and Chemical Toxicology**, v.44, n.3, p.388-392, 2006.

CELADA, P.; PUIG, M.; AMARGÓS-BOSCH, M.; ADELL, A.; ARTIGAS, F. The therapeutic role of 5-HT1A and 5-HT2A receptors in depression. **Journal of Psychiatry Neuroscience**, v.29, n.4, p.:252-265, 2004.

CLEARE, A.J. Phentermine, psychosis, and family history. **Journal of Clinical Psychopharmacology**, v.16, p.470-471, 1996.

CLOUATRE, D.L. Kava kava: examining new reports of toxicity. **Toxicology Letters**, v.150, n.1, p.85-96, 2004.

COLLINS, A.R. et al. The comet assay: topical issues. **Mutagenesis**, v.23, n.3, p. 143–151, 2008.

COTTAM, D.R. et al. Dysfunctional immune-privilege in morbid obesity: implications and effect of gastric bypass surgery. **Obesity Surgery**, v.13, n.1, p.49-57, 2003.

CUADRA, G.; ZURITA, A.; GIOINO, G.; MOLINA, V. Influence of different antidepressant drugs on the effect of chronic variable stress on restraint-induced dopamine release in frontal cortex. **Neuropsychopharmacology**, v.25, n.3, p.384-394, 2001.

CUNHA, J.M.; MASUR, J. Evaluation of psychotropic drugs with a modified open field test. **Pharmacology**, v.16, p.259-267, 1978.

DAILLY, E.; CHENU, F.; RENARD, C.E.; BOURIN, M. Dopamine, depression and antidepressants. **Fundamental and Clinical Pharmacology**, v.18, n.6, p.601-607, 2004.

DALL'ACQUA, S.; INNOCENTI, G. Steroidal glycosides from *Hoodia gordonii*. **Steroids**, v. 72, p.559-568, 2007.

D'ALMEIDA, V.; CAMARINI, R.; AZZALIS, L.A.; MATTEI, R.; JUNQUEIRA, V.B. CARLINI, E.A. Antioxidant defense in rat brain after chronic treatment with anorectic drugs. **Toxicology Letters**, v.81, p.101–105, 1995.

DANDIYA, P.C.; GUPTA, B.D.; GUPTA, M.L.; PATNI, S.K. Effects of LSD on open field performance in rats. **Psychopharmacology**, v.15, p.333-340, 1969.

DANTAS, J.A.; AMBIEL, C.R.; CUMAN, R.K.N.; BARONI, S.; BERSANI-AMADO, C.A. Reference values of the physiological parameters of rats in the Central animal laboratory of the State University of Maringá, State Paraná. **Acta Bioética**, v.28, p.165-170, 2006.

D'AQUILA, P.S.; COLLU, M.; DEVOTO, P.; SERRA, G. Chronic lithium chloride fails to prevent imipramine-induced sensitization to the dopamine D(2)-like receptor agonist quinpirole. **European Journal of Pharmacology**, v.395, n.2, p.157-60, 2000.

DAWSON, G.R.; CRAWFORD, S.P.; COLLINSON, N.; IVERSEN, S.D.; TRICKLEBANK, M.D. Evidence that the anxiolytic-like effects of chlordiazepoxide on the elevated plus maze are confounded by increases in locomotor activity. **Psychopharmacology** (Berl). 118(3):316-23, 1995.

DENT, M.P.; WOLTERBEEK, A.P.M.; RUSSELL, P.J.; BRADFORD, R. Safety profile of *Hoodia gordonii* extract: Mouse prenatal developmental toxicity study. **Food and Chemical Toxicology**, v.50, p.20–25, 2012.

DILEONE, R.J. The influence of leptin on the dopamine system and implications for ingestive behavior. **International Journal of Obesity** (Lond), v. 33, S25-9, 2009.

DOUGLAS, A.; DOUGLAS, J.G.; ROBERTSON, C.E.; MUNRO, J.F. Plasma phentermine levels, weight loss and side-effects. **International Journal of Obesity**, v.7, n.6, p.591-595, 1983.

DRAGO, F. The expression of neuropeptide-induced excessive grooming behavior in dopamine D1 and D2 receptor-deficient mice. **European Journal of Pharmacology**, v.365, p.125–131, 1999.

DREVER, N. et al. The expression of antioxidant enzymes in a mouse model of fetal alcohol syndrome. **Am J Obstet Gynecol**, v. 206, n. 4, p. 358 e19-22, 2012.

DUNN, A.J.; GUILD, A.L.; KRAMARCY, N.R.; WARE, M.D. Benzodiazepines decrease grooming in response to novelty but not ACTh or beta-endorphin. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 15, p. 605-608, 1981.

EISERICH, J. P.; PATEL, R. P.; O'DONNELL, V. B. Pathophysiology of nitric oxide and related species: free radical reactions and modification of biomolecules. **Molecular Aspects of Medicine**, v.19, p.221-357, 1998.

ELFHAG, K.; RÖSSNER, S.; BARKELING, B.; ROOTH, P. Sibutramine treatment in obesity: initial eating behaviour in relation to weight loss results and changes in mood. **Pharmacology Research**, v.51, p.159-163, 2005.

ELHWUEGI, A.S. Central monoamines and their role in major depression. **Progress in Neuropsychopharmacol & Biological Psychiatry**, v.28, n.3, p.435-451, 2004.

EL-TAWIL, O.S.; ABOU-HADEED, A.H.; EL-BABC, M. F.; SHALABY, A.A. d-Amphetamine-induced cytotoxicity and oxidative stress in isolated rat hepatocytes. **Pathophysiology**, v.18, n.4, p.279-285, 2011.

ENDRESS, M.E.; BRUYNS, P.V. A revised classification of the Apocynaceae s.l. **The Botanical Review**, v. 66, p, 1–56, 2000.

FAINTUCH, J. et al. Systemic inflammation in morbidly obese subjects: response to oral supplementation with alpha-linolenic acid. **Obesity Surgery**, v.17, n.3, p.341-347, 2007.

FAULCONBRIDGE, L.F. et al. Changes in symptoms of depression with weight loss: results of a randomized trial. **Obesity** (Silver Spring). v.17, n.5, p.100910-16, 2009.

FAUST, F.; KASSIE, F.; KNASMULLER, S.; BOEDECKER, R.H.; MANN, M.; MERSCH-SUNDERMANN, V. The use of the alkaline comet assay with lymphocytes in human biomonitoring studies. **Mutation Research**, v.566, p.209-229, 2004.

FEIJÓ, F. M.; BERTOLUCI, M.C.; REIS, C. Serotonin and hypothalamic control of hunger: a review. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v.57, n.1, p.74-77, 2011.

FERNANDES, C.; FILE, S.E. The influence of open arm ledges and maze experience in the elevated plus-maze. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v.54, n.1, p.31-40, 1996.

FERNANDEZ-TERUEL, A. et al. Early-life handling stimulation and environmental enrichment are some of their effects mediated by similar neural mechanisms? **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 73, p. 233–245, 2002.

FERREIRA, L.; GOMES, E. Estudo Sobre a Eficácia do Uso de Inibidores da Recaptação de Norepinefrina e Serotonina no Tratamento da Obesidade. **Revista Saúde e Pesquisa**, v.2, n.3, p.363-369, 2009.

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 43, n. 1, p. 61-68, 1997.

FETISSOV, S.O.; MEGUID, M.M.; CHEN, C.; MIYATA, G. Synchronized release of dopamine and serotonin in the medial and lateral hypothalamus of rats. **Neuroscience**, v.101, n.3, p.657-663, 2000.

FLORENTIN, M.; LIBEROPOULOS, E. N.; ELISAF, M. S. Sibutramine-associated adverse effects: a practical guide for its safe use. **Obesity reviews**, v.9, p.378–387, 2008.

FOLDEN, W. Information document on trade in *Hoodia gordonii* and other *Hoodia* species. S A National Biodiversity Institute, 2008. Disponível em <www.plantzafrica.com/frames/plantsfram.htm>, Acessado em 03 jun 2009.

FONSECA, C.A.; PEREIRA, D.G. Aplicação da genética toxicológica em planta com atividade medicinal. **Infarma**, v. 16, n. 7/8, p. 51-54, 2004.

FRANK, G.K. et al. Increased dopamine D2/D3 receptor binding after recovery from anorexia nervosa measured by positron emission tomography and [11c]raclopride. **Biology Psychiatry**, v.58, n.11, p.908-912, 2005.

FREY, B.N.; ANDREAZZA, A.C.; PETRONILHO, F.C.; DAL-PIZZOL, F.; QUEVEDO, J.; KAPCZINSKI, F. Increased oxidative stress after repeated amphetamine exposure: possible relevance as an animal model of acute mania. **Bipolar Disorders**, v.8, n.3, p.275-280, 2006.

FURUKAWA, S. et al. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. **The Journal of Clinical Investigation**, v.114, n.12, p.1752-1761, 2004.

FUEMMELER, B.F.; AGURS-COLLINS, T.; MCCLERNON, F.J.; COLLINS, S.H.; GARRETT, M.E.; ASHLEYKOCH, A.E. Interactions Between Genotype and Depressive Symptoms on Obesity. **Behavior Genetics**, v.39, p.296–305, 2009.

GALLIERI, A.P.V.; WASICKY, A.; RODRIGUES, V.; ELIFIO-ESPOSITO, S.; PEREIRA, L.F. Análise de parâmetros bioquímicos do sangue de camundongos tratados com lidocaína. **Boletín de Estudios medicos y Biológicos**, v.28, p.67-73, 2006.

GALVAN-ARZATE, S.; SANTAMARIA, A. Neurotoxicity of diethylpropion: neurochemical and behavioral findings in rats. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 965, p. 214-224, 2002.

GAMARO, G.D.; MANOLI, L.P.; TORRES, I.L.; SILVEIRA, R.; DALMAZ, C. Effects of chronic variate stress on feeding behavior and on monoamine levels in different rat brain structures. **Neurochemistry International**, v.42, n.2, p.107-114, 2003.

GARDIER, A.M. et al. Recepteurs 5HT1B de la serotonine et effets antidepressurs des inhibiteurs de recapture selectif de la serotonine. **CR Academic Science Paris Life**, v.324, p.433-441, 2001.

GARFIELD, A.S.; HEISLER, L.K. Pharmacological Targeting of the Serotonergic System for the Treatment of Obesity. **Journal of Physiology**, v.587, n.1, p.49-60, 2009.

GEHLERT, D.R. et al. The selective norepinephrine reuptake inhibitor, LY368975, reduces food consumption in animal models of feeding. **The Journal of Pharmacology Experimental Therapeutics**, v.287, n.1, p.122-127, 1998.

GEIGER, B.M. et al. Evidence for defective mesolimbic dopamine exocytosis in obesity-prone rats. **FASEB Journal**, v.22, n.8, p.2740-2746, 2008.

GILAT, E. et al. Anticonvulsant treatment of sarin-induced seizures with nasal midazolam: An electrographic, behavioral, and histological study in freely moving rats. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.209, p.74 – 85, 2005.

GINAWI, O.T.; AL-MAJED, A.A.; AL-SUWAILLEN, A.K. NAN-190, a possible specific antagonist for methamphetamine. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 41, p. 122–127, 2005a.

GINAWI, O.T.; AL-MAJED, A.A.; AL-SUWAILLEN, A.K. Ondansetron, a selective 5-HT₃ antagonist, antagonizes methamphetamine-induced anorexia in mice. **Pharmacological Research**, v. 51, p.255–259, 2005b.

GISPEN, W. H.; ISAACSON R. LACTH-induced excessive grooming in the rat. **Pharmacology Therapy**, v.12, p.209-246, 1981.

GLICK, S.D. et al. Enantioselective behavioral effects of sibutramine metabolites. **European Journal of Pharmacology**, v.397, p. 93–102, 2000.

GLUCK, M.R. et al. Parallel increases in lipid and protein oxidative markers in several mouse brain regions after methamphetamine treatment. **Journal of Neurochemistry**, v.79, p.152-160, 2001.

GOKCEL, A. et al. Evaluation of the safety and efficacy of sibutramine, orlistat and metformin in the treatment of obesity. **Diabetes, obesity and metabolism**, v.4, p.49-55, 2002.

GOLDFIELD, G.S.; LORELLO, C.; DOUCET, E. Methylphenidate reduces energy intake and dietary fat intake in adults: a mechanism of reduced reinforcing value of food? **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.86, n.2, p.308-315, 2007.

GONÇALVES, S.; MARIA, A.V.; SILVA, A.S.; MARTINS-SILVA, J.; SALDANHA, C. Phytosterols in milk as a depressor of plasma cholesterol levels: experimental evidence with hypercholesterolemic Portuguese subjects. **Clinical Hemorheology and Microcirculation**, v.35, n.1-2, p.251-255, 2006.

GREEN LC, WAGNER DA, GLOGOWSKI J, SKIPPER PL, WISHNOK JS, TANNENBAUM SR. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids. **Analytical Biochemistry**. v.126, n.1, p.131-138, 1982.

GULLICH, I. RAMOS, A.B.; ZAN, T.R.A.; SCHERER, C.; MENDOZA-SASSI, R.A. Prevalence of anxiety in patients admitted to a university hospital in southern Brazil and associated factors. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v.16, n.3, 2013.

GUY-GRAND, B.; APFELBAUM, M.; CREPALDI, G.; GRIES, A.; LEFEBVRE, P.; TURNER, P. International trial of long-term dexfenfluramine in obesity. **The Lancet**, v. 2, p.1142-1145, 1989.

HAINER, V.; KABRNOVA, K.; ALDHOON, B.; KUNESOVA, M.; WAGENKNECHT, M. Serotonin and norepinephrine reuptake inhibition and eating behavior. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1083, p.252-269, 2006.

HALLIWELL, B. Reactive oxygen species and the central nervous system. **Journal of Neurochemistry**, v. 59, p. 1609-1623, 1992.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. **Methods in Enzymology**, v. 186, p.1-85, 1990.

HALLIWELL, B. Free Radicals and other reactive species in Disease. **Encyclopedia of Life Sciences**, p.1-7, 2001.

HALLMAN, H.; JONSSON, G. Monoamine neurotransmitter metabolism in microencephalic rat brain after prenatal methylazoxymethanol treatment. **Brain Research Bulletin**, v. 13, n. 3, p. 383-389, 1984.

HALPERN, A.; MANCINI, M.C. Treatment of obesity: an update on anti-obesity medications. **Obesity Reviews**, v. 4, p.25-42, 2003.

HAMMER, V.A.; GIETZEN, D.W.; SWORTS, V.D.; BEVERLY, J.L.; ROGERS, Q.R. Adrenal hormones and the anorectic response and adaptation of rats to amino acid imbalance. **Journal of Nutrition**, v.120, n.12, p.1617-23, 1990.

HANDLEY, S. L.; MITHANI, S. Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of 'fear'- motivated behaviour. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v.327, p.1-5, 1984.

HARTMANN, A.; SPEIT, G. The contribution of cytotoxicity to DNA effects in the single cell gel test (comet assay). **Toxicology Letters**, v.90, p.183-188, 1997.

HAZENBERG, B.P. Randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter study of sibutramine in obese hypertensive patients. **Cardiology**, v. 94, n.3, p.152-8, 2000.

HEISLER, L.K. et al. Serotonin activates the hypothalamic-pituitary-adrenal axis via serotonin 2C receptor stimulation. **Journal of Neuroscience**, v.27, n.26, p.6956-64, 2007.

HERMSDORFF, H.H.M.; MONTEIRO, J.B.R. Gordura visceral, subcutânea ou intramuscular: onde está o problema? **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v.48, n.6, p.803-811, 2004.

HERSHKO, C. Mechanism of iron toxicity and its possible role in red cell membrane damage. **Seminars in Hematology**, v.26, n.4, p.277-285, 1989.

HONÓRIO JUNIOR, J.E.R. et al. Monocrotaline: Histological Damage and Oxidant Activity in Brain Areas of Mice. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, p.1-10. 2012.

HORAK, R.M.; MAHARAJ, V.; HAKKINEN, J. Steroidal glycosides or plant extracts for treatment of gastric acid secretion damage. European Patent Application EP 2000-309271, 2001.

HSU, GHUNG-HUA; TSAI TUNG-HU; KAO YUNG-HSI; HWANG KUNG-SHANG; TSENG TING-YU; CHOU PESUS. Effect of green tea extract on obese women: A randomized, double-blind, placebo controlled clinical trial. **Clinical Nutrition**, v.27, p.363-370, 2008.

HUANG, X. Study on colour reaction of iron(II)-thibarbituric acid-nitrite system and its analytical application]. **Guang Pu Xue Yu Guang Pu Fen Xi**, v.18, n.6, p.759-761, 1998.

HUGHES, R.N. Chlordiazepoxide-modified exploration in rats. **Psychopharmacology**, v.24, p.462-469, 1972.

HUGHES, A.A.; HEIMBERG, R.G.; COLES, M.E.; GIBB, B.E.; LIEBOWITZ, M.R.; SCHNEIER, F.R. Relations of factors of the tripartite model of anxiety and depression to types of social anxiety. **Behavior Research and Therapy**, v. 44, p. 1629-1641, 2006.

JACKSON, H.C.; BEARHAM, M.C.; HUTCHINS, L.J.; MAZURKIEWICZ, S.E.; NEEDHAM, A.M.; HEAL, D.J. Investigation of the mechanisms underlying the hypophagic effects of the 5-HT and noradrenaline reuptake inhibitor, sibutramine, in the rat. **British Journal of Pharmacology**, v.121, n.8, p.1613-1818, 1997.

JAVED, A.; VAN DE KAR, L.D.; GRAY, T.S. The 5-HT_{1A} and 5-HT_{2A/2C} receptor antagonists WAY-100635 and ritanserin do not attenuate D -fenfluramine-induced Fos expression in the brain. **Brain Research**, v.791, n.1-2, p.67-74, 1998.

JAYANTHI, S.; LADENHEIM, B.; CADET, J.L. Methamphetamine induced changes in antioxidant enzymes and lipid peroxidation in copper/zinc-superoxide dismutase transgenic mice. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.844, p.92-102, 1998.

JOHANSSON, C.; AHLENIUS, S. Evidence for the involvement of 5-HT_{1A} receptors in the mediation of exploratory locomotor activity in the rat. **Journal of Psychopharmacology**, v. 3, p. 32-35, 1989.

JANHUNEN, S.K.; VAN DER ZWAAL, E.M.; LA FLEUR, S.E.; ADAN, R.A. Inverse agonism at α 2A adrenoceptors augments the hypophagic effect of sibutramine in rats. **Obesity (Silver Spring)**. v.19, n.10, p.1979-1986, 2011.

JOHNSON, P. M.; KENNY, P. J. Dopamine D2 receptors in addiction-like reward dysfunction and compulsive eating in obese rats. **Nature Neuroscience**, v. 13, p.635-641, 2010.

KALIA, M. Neurobiological basis of depression: an update. **Metabolism: Clinical and Experimental**, v.54, n.5, Suppl 1, p.24-27, 2005.

KEHER, J.P. Free radicals as mediators of tissue injury and disease. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 114, p. 21- 48, 1993.

KHANNA, K.K.; LAVIN, M.F.; JACKSON, S.P.; MULHERN, T.D. ATM, a central controller of cellular responses to DNA damage. **Cell Death and Differentiation**, v.8, n.11, p.1052-1065, 2001.

KIM, J.H.; KANG, S.A.; HAN, SEUNG-MOO; SHIM, I. Comparison of the Antiobesity effects of the protopanaxadiol- and protopanaxatriol-type Saponins of Red Ginseng. **Phytotherapy Research**, v.23, p.78-85, 2009.

KONUKOGLU, D. et al. Plasma homocysteine levels in obese and non-obese subjects with or without hypertension; its relationship with oxidative stress and copper. **Clinical of Biochemistry**, v.36, n.5, p.405–408, 2003.

KORDIK, C.P.; REITZ, A.B. Pharmacological Treatment of obesity: therapeutic strategies. **Journal of Medicinal Chemistry**, v.42, n.2, p. 181–201, 1999.

KRELL, H.V.; LEUCHTER, A.F.; COOK, I.A.; ABRAMS, M. Evaluation of reboxetine, a noradrenergic antidepressant, for the treatment of fibromyalgia and chronic low back pain. **Psychosomatics**, v.46, n.5, p.379-384, 2005.

KUO, D.Y.; YANG, S.F.; CHU, S.C.; CHU, S.C.; CHEN, C.H.; HSIEH, Y.S. Amphetamine-evoked changes of oxidative stress and neuropeptide Y gene expression in hypothalamus: regulation by the protein kinase C-delta signaling. *Chemico-Biological Interactions*, v. 15,180, n. 2, p.193-201, 2009.

KUZMINOV, A. DNA replication meets genetic exchange: chromosomal damage and its repair by homologous recombination. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.98, n.15, p.8461-8468, 2001.

LAVIANO, A.; MEGUID, M.M. Serotonin and obesity. **Current Medicinal Chemistry**, v.3, n.2, p. 89-100, 2003.

LEE, R.A.; BALICK, M.J. Indigenous use of *Hoodia gordonii* and appetite suppression. *Explore (NY)*, v.3, n.4, p.404-406, 2007.

LEE, R.F.; STEINERT, S. Use of the single cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals. **Mutation Research**, v.544, n.1, p.43-64, 2003.

LEIBOWITZ, S.F.; WEISS, G.F.; SHOR-POSNER, G. Hypothalamic serotonin: Pharmacological, biochemical, and behavioral analyses of its feeding-suppressive action. **Clinical of Neuropharmacology**, New York, v.11, p.S51-S71, 1988.

LI, YU-WEN, et al. Monoamine reuptake site occupance of sibutramine: Relationship to antidepressant-like and thermogenic-effects in rats. **Neuropharmacology and Analgesia**, v.737, p.47-56, 2014.

LISTER, R.G. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. **Psychopharmacology**, v. 92, p. 180-185, 1987.

LOHMAN, P.H.M.; GENTILE, J.M.; GENTILE, G.; FERGUSON, L.R. Antimutagenesis/anticarcinogenesis: screening, methods and biomarkers. **Mutation Research**, v. 496, p. 1-4, 2001.

LOVELL, D.P.; THOMAS, G.; DUBROW, R. Issue related to the experimental design and subsequent statistical analysis of *in vivo* and *in vitro* comet assay. **Teratogenesis, Carcinogenesis and Mutagenesis**, v.19, p.109-119, 1999.

LOWRY, H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurements with the folin phenol reagent. **Journal of Biologic Chemical**, v. 193, n. 1, p. 265-275, 1951.

LU, T.Y.; KUPA, A.; EASTERBROOK, G.; MANGONI, A.A. Profound weight loss associated with reboxetine use in a 44-year-old woman. **Brazilian Journal of Clinical Pharmacology**, v.60, n.2, p.218-20, 2005.

LUSCOMBE, G.P.; MARTIN, K.F.; HUTCHINS, L.J.; GOSDEN, J.; HEAL, D.J. Mediation of the antidepressant-like effect of 8-OH-DPAT in mice by postsynaptic 5-HT_{1A} receptors. **British Journal Pharmacology**, v.108, n.3, p.669-677, 1993.

MACÊDO, D. S. **Estudo farmacológico e de alterações neuroquímicas em córtex pré-frontal e corpo estriado de camundongos após convulsões e morte induzidas por overdose de cocaína**. 2005. 294 f. Tese (Doutorado em Farmacologia) - Programa de Pós-graduação em Farmacologia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2005.

MACHADO, D.G. et al. Antidepressant-like effect of the extract from leaves of *Schinus molle* L. in mice: evidence for the involvement of the monoaminergic system. **Progress in Neuropsychopharmacology, Biology and Psychiatry**, v.31, n.2, p.421-8, 2007.

MACLEAN, D.B.; LUO, L.G. Increased ATP content/production in the hypothalamus may be a signal for energy-sensing of satiety: studies of the anorectic mechanism of a plant steroidal glycoside. **Brain Research**, v.1020, p.1-11, 2004.

MACNEIL, D.J. NPY Y1 and Y5 receptor selective antagonists as anti-obesity drugs. **Current Top Medicinal Chemistry**, v. 7, n. 17, p. 1721-1733, 2007.

MAEHLY, A.C.; CHANCE, B. The assay of catalases and peroxidases. **Methods and Biochemical Analysis**, v. 1, p. 357-424, 1954.

MAGDULA, V.L.M. et al. Bioavailability, Pharmacokinetics, and Tissue Distribution of the Oxypregnane Steroidal Glycoside P57AS3 (P57) from *Hoodia gordonii* in Mouse Model. **Planta Medica**, v. 76, n.14, p. 1582-1586, 2010.

MAGKOS, F. et al Effect of obesity on the plasma lipoprotein subclass profile in normoglycemic and normolipidemic men and women. **International Journal of Obesity (Lond)**, v.32, n.11, p.1655-1664, 2008.

MALNICK, S.D., KNOBLER, H. **The medical complications of obesity**. QJM 99, 565–579, 2006.

MANCINI, M.C.; HALPERN, A. Tratamento farmacológico da obesidade. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 46, n. 5, p. 497-512, 2002.

MANSUR, J.; MARTZ, R.M.W.; CARLINI, E.A. Effects of acute and chronic administration of cannabis sativa and (-) 9-trans tetrahydrocannabinol on the behavior of rats in open field arena. **Psychopharmacology**, v. 19, p. 338-397, 1971.

MARGULES, D.L. Alpha-adrenergic receptors in hypothalamus for the suppression of feeding behavior by satiety. **Journal of Comparative and Physiological Psychology**, v.73, n.1, p.1-12, 1970.

MARIZ, S.R. et al. Acute toxicity study of the ethanol extract of *Jatropha gossypifolia* L. in rats. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.16, p.372-378, 2006.

MARTIN, C.K. et al. Lorcaserin, a 5-HT (2C) receptor agonist, reduces body weight by decreasing energy intake without influencing energy expenditure. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v.96, p.837-845, 2011.

MARKHAM C.M.; YANG M.; BLANCHARD R.J.; BLANCHARD D.C. Effects of D-amphetamine on defensive behaviors related to fear and anxiety. **Pharmacology**, v.83, p.490-499, 2006.

MARUYAMA, T. et al. Discovery of novel thiourea derivatives as potent and selective beta3-adrenergic receptor agonists. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 17, n.15, p.5510-5519, 2009.

MELO, C.T. et al. Evidence for the involvement of the serotonergic, noradrenergic, and dopaminergic systems in the antidepressant-like action of riparin III obtained from *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae) in mice. **Fundamental and Clinical Pharmacology**, v.27, n.1, p.104-

12, 2013.

MELO, F.H.C. et al. Antidepressant-like effect of carvacrol (5-Isopropyl-2-methylphenol) in mice: involvement of dopaminergic system. **Fundamental and Clinical Pharmacology**, v.25, n.3, p.362-7, 2011.

MINER, J.L. The adipocyte as an endocrine cell. **Journal of Animal Science**, v.82, n.3, p.935-941, 2004.

MIQUEL, M.C. et al. Differential subcellular localization of the 5-HT_{3A}s receptor subunit in the rat central nervous system. **European Journal of Neuroscience**, v.15, n.3, p.449-457, 2002.

MIRZA, B.; IKRAM, H.; BILGRAMI, S.; HALEEM, D.J.; HALEEM, M.A. Neurochemical and behavioral effects of green tea (*Camellia sinensis*): a model study. **Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.26, n.3, p.511-516, 2013.

MITANI, H.; SHIRAYAMA, Y.; YAMADA, T.; KAWAHARA, R. Plasma levels of homovanillic acid, 5-hydroxyindoleacetic acid and cortisol, and serotonin turnover in depressed patients. **Progress Neuropsychopharmacology & Biology Psychiatry**, v.30, n.3, p.531-534, 2006.

MOHLAPO, T.D.; NG'AMBI, J.W.; NORRIS, D.; MALATJE, M.M. Effect of *Hoodia gordonii* meal supplementation at finisher stage on productivity and carcass characteristics of Ross 308 broiler chickens. **Tropical Animal Health Production**, 2009 [Epub ahead of print].

MONTGOMERY, K.C. The relationship between fear induced by novel stimulation and exploratory behaviour. **Journal of comparative and physiological psychology**, v.48, p.254-260, 1958.

MOODY, T.W.; MERALI, Z.; CRAWLEY, J.N. The effects of anxiolytics and other agents on rat grooming behavior. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 90, p. 281-290, 1993.

MOSLEY, R.L. et al. Neuroinflammation, Oxidative Stress and the Pathogenesis of Parkinson's Disease. **Clinical Neuroscience Research**, v.6, n.5, p.261-281, 2006.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 16, p.55-63, 1983.

MOURA, B.A. **Avaliação das alterações comportamentais, neuroquímicas e bioquímicas em ratos tratados durante oito dias com *Hoodia gordonii*, um supressor natural do apetite.** Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Programa de Pós Graduação em Farmacologia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, 2012.

MUELLER, K.; KUNKO, P.M.; WHITESIDE, D.; HASKETT, C. Time course of amphetamine-induced locomotor stereotypy in an open field. **Psychopharmacology**, v. 99, p. 501-507, 1989.

NAFFAH-MAZZACORATTI, M.G.; CAVALHEIRO, E.A.; FERREIRA, E.C.; ABDALLA, D.S.P.; AMADO, D.; BELLISIMO, M.I. Superoxide dismutase, glutathione peroxidase activities and the hydroperoxide concentration are modified in the hippocampus of epileptic rats. **Epilepsy Research**, v. 46, p. 121-128, 2001.

NAKAGAWA, T.; UKAI, K.; OHYAMA, T.; GOMITA, Y.; OKAMURA, H. Effects of chronic administration of sibutramine on body weight, food intake and motor activity in neonatally monosodium glutamate-treated obese female rats: relationship of antiobesity effect with monoamines. **Experimental Animals**, v.49, n.4, p.239-249, 2000.

NAKAGAWA, Y.; SUZUKI, T.; KAMIMURA, H.; NAGAI, F. N -Nitrosufenfluramine induces cytotoxicity via mitochondrial dysfunction and oxidative stress in isolated rat hepatocytes. **Archives of Toxicology**, v.79, p.312–320, 2005.

NAKAMURA, T.; LIPTON, S.A. According to GOSPEL: filling in the GAP(DH) of NO-mediated neurotoxicity. **Neuron**, v.63, n.1, p.3-6, 2009.

NAVES, A.; PASCHOAL, V.C.P. Regulação funcional da obesidade. **Consciencie Saúde**, São Paulo, v. 6, n.1, p.189-199, 2007.

NEVE, M.J.; COLLINS, C.E.; MORGAN, P.J. Dropout, nonusage attrition, and pretreatment predictors of nonusage attrition in a commercial Web-based weight loss program. **Journal of Medical Internet Research**, v.12, n.4, e69, 2010.

NEWSOME, B.J. et al. Green tea diet decreases PCB 126-induced oxidative stress in mice by up-regulating antioxidant enzymes. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v.25, p. 126–135, 2014.

NGONDI, J.L.; ETOUNDI, B.C.; NYANGONO, C.B.; MBOFUNG, C.M.F.; OBEN, J.E. IGOB131, a novel seed extract of the West African plant *Irvingia gabonensis*, significantly reduces body weight and improves metabolic parameters in overweight humans in a

randomized double-blind placebo controlled investigation. **Lipids Health Disease**, v.8, p.1-7, 2009.

OECD Guideline for testing of chemicals. Acute oral toxicity – Up and down procedure. 2001, 1-26.

OHL, F. Testing for anxiety. **Clinical Neuroscience Research**, v.3, p.233-238, 2003.

OMACHI, A.; ISHIOKA, K.; UOZUMI, A.; KAMIKAWA, A.; TODA, C.; KIMURA, K.; SAITO, M. Beta3-adrenoceptor agonist AJ-9677 reduces body fat in obese beagles. **Research in Veterinary Science**, v. 83, n. 1, p. 5-11, 2007.

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

PALMITER, R.D. Is dopamine a physiologically relevant mediator of feeding behavior? **Trends Neuroscience**, v. 30, p.375–381, 2007.

PELLOW, S.; CHOPIN, P.; FILE, S.E.; BRILEY, M. Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **Journal of Neuroscience Methods**, v.14, n.3, p.149-167, 1985.

PEREZ, R.M.G.; PEREZ, J.A.L.; GARCIA, L.D.M.; SOSSA, H.M. Neuropharmacological activity of Solanumnigrum fruit. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 62, p. 43-48, 1998.

PERRIO, M.J.; WILTON, L.V.; SHAKIR, S.A. The safety profiles of orlistat and sibutramine: results of prescription-event monitoring studies in England. **Obesity** (Silver Spring). v.15, n.11, p.2712-2722, 2007.

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

PRUT, L.; BELZUNG, C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. **European Journal of Pharmacology**, v.463, n.1-3, p.3-33, 2003.

QUEIROZ, D.L. Farmacoterapia da obesidade. **Revista de Medicina Militar**, v. 45, n. 3, p. 191-197, 2008.

RADENOVIC, L.; VASILJEVIS, I.; SELAKOVIC, V.; JOVANOVIC, M. 7-Nitroindazole reduces nitrite concentration in rat brain after intrahippocampal kainate-induced seizure. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.135, p. 443-450, 2003.

RADOMINSKI, R.B. et al. **Atualização das Diretrizes para o Tratamento Farmacológico da Obesidade e do Sobrepeso**. 4 – ABESO 76 – Outubro 2010.

RAISON, C.L.; KLEIN, H.M. Psychotic mania associated with fenfluramine and phentermine use. **The American Journal of Psychiatry**, v.154, p.711, 1997.

RAMOS, E.J.; MEGUID, M.M.; CAMPOS, A.C.; COELHO, J.C. Neuropeptide Y, alpha-melanocyte-stimulating hormone, and monoamines in food intake regulation. **Nutrition**, v.21, n.2, p.269-279, 2005.

RAMPES, F. et al. Effects of a longitudinal training program on responses to exercise in overweight men. **Obesity Research**, v.11, n.2, p.247-256, 2003.

REDROBE, J.P.; BOURIN, M.; COLOMBEL, M.C.; BAKER, G.B. Psychopharmacological profile of the selective serotonin reuptake inhibitor, paroxetine: implication of noradrenergic and serotonergic mechanisms. **Journal of Psychopharmacology**, v.12, n.4, p.348-355, 1998.

REX, A.; STEPHENS, D.N.; FINK, H. "Anxiolytic" action of diazepam and abecarnil in a modified open field test. **Pharmacology Biochemistry and Behaviour**, v.53, n.4, p.1005-1011, 1996.

RIBEIRO, L.R.; MARQUES, E.K. A importância da mutagênese ambiental na carcinogênese humana. In: RIBEIRO, R.L. **Mutagênese ambiental**. Canoas, RS. Ed Ulbra, 2003. p.173-198.

ROSS, D.; MOLDEUS, P. **Antioxidant defense systems and oxidative stress**. In Vigo-Pelfrey C. Membrane lipid oxidation. 1 ed. Boca Raton, CRC Press, p.151-170, 1991.

ROSMOND, R. A etiology of obesity: a striving after wind? **Obesity Review**, v.5, n.4, p.177-181, 2004.

ROSSI, L.; TIRAPEGUI, J. Serotonergic system and its implications on physical exercise]. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v.48, n.2, p.227-233, 2004.

ROTHMAN, R.B.; CLARK, R.D.; PARTILLA, J.S.; BAUMANN, M.H. (+)-Fenfluramine and its major metabolite, (+)-norfenfluramine, are potent substrates for norepinephrine transporters. The **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.305, n.3, p.1191-1199, 2003.

ROWE, L.A.; DEGTYAREVA, N.; DOETSCH, P.W. DNA damage-induced reactive oxygen species (ROS) stress response in *Saccharomyces cerevisiae*. **Free Radical Biology & Medicine**, v.45, n.8, p.1167-1177, 2008.

RUBIN, I.D. CAWTHORNE, M.A. BINDRA, J.S. Extracts, compounds and pharmaceutical compositions having anti-diabetic activity and their use. European Patent, EP 2001-305172, 1166792, p. 26, 2002.

SALAS R.; PIERI F.; FUNG B.; DANI J.A.; DE BIASI M. Altered anxiety-related responses in mutant mice lacking the $\beta 4$ subunit of the nicotinic receptor. **Journal of Neuroscience**, v.23, p.6255–6263, 2003.

SALMON, T.B.; EVERT, B.A.; SONG, B.; DOETSCH, P.W. Biological consequences of oxidative stress-induced DNA damage in *Saccharomyces cerevisiae*. **Nucleic Acids Researchs**, v.32, n.12, p.3712-3723, 2004.

SALVADORI, A. et al. Kinetics of catecholamines and potassium, and heart rate during exercise testing in obese subjects. Heart rate regulation in obesity during exercise. **European Journal of Nutrition**, v.42, n.4, p.181-7, 2003.

SANTOS, R.O. et al. Evaluation of the effect of acute sibutramine in female rats in the elevated T-maze and elevated plus-maze tests. **Basic & Clinical Pharmacology and Toxicology**, v.114, n.2, p.181-187, 2014.

SATOH, K. et al. Effects of N-nitrosofenfluramine, a component of Chinese dietary supplement for weight loss, on CD-1 mice. **Archives of Toxicology**, v.80, n.9, p.605-613, 2006.

SCHEEN, A.J.; LEFÉBVRE, P.J. Pharmacological treatment of obesity: present status. **International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders**, v.23, Suppl 1, p.47-53, 1999.

SCHELLEKENS H.; CLARKE, G.; JEFFERY, I.B.; DINAN, T.G.; CRYAN, J.F. Dynamic 5-HT_{2C} receptor editing in a mouse model of obesity. **PLoS One**, v.7, n.3, e32266, 2012.

SCHWARTZ, M.W.; WOODS, S.C.; PORTE, D.J.R.; SEELEY, R.J.; BASKIN, D.G. Central nervous system control of food intake. **Nature**, v. 404, p.661– 671, 2000.

SCOTT, M.D.; LUBIN, B.H.; ZUO, L.; KUYPERS, F.A. Erythrocyte defense against hydrogen peroxide: preeminent importance of catalase. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, v.118, n.1, p.7-16, 1991.

SCOTT, A.D.; ORSI, A.; WARD, C.; BRADFORD, R. Genotoxicity testing of a *Hoodia gordonii* extract. **Food and Chemical Toxicology**, v.50 Suppl 1:S34-40, 2012.

SEDLAK, J.; LINDSAY, R.H. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. **Analytical Biochemistry**, v. 24-25, n. 1, p. 192-205, 1968.

SEQUEIRA-CORDERO, A.; MORA-GALLEGOS, A.; CUENCA-BERGER, P.; FORNAGUERA-TRÍAS, J. Individual differences in the forced swimming test and the effect of environmental enrichment: searching for an interaction. **Neuroscience**, v.265, p.95-107, 2014.

SEWTER, C.P.; DIGBY, J.E.; BLOWS, F.; PRINS, J.; O'RAHILLY, S. Regulation of tumour necrosis factor-alpha release from human adipose tissue in vitro. **Journal of Endocrinology**, v.163, n.1, p.33-38, 1999.

SHAN, X.Q.; AW, T.Y.; JONES, D.P. Glutathione-dependent protection against oxidative injury. **Pharmacology Therapeutical**, v.47, n.1, p.61-71, 1990.

SHIWAKU, K. et al. Difficulty in losing weight by behavioral intervention for women with Trp64Arg polymorphism of the beta3-adrenergic receptor gene. **International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders**, v. 27, n.9, p.1028-1036, 2003.

SILVA, C.J.; SANTOS, J.E.; TAKAHASHI, C.S. An evaluation of the genotoxic and cytotoxic effects of the anti-obesity drugs sibutramine and fenproporex. **Humann and Experimental Toxicology**, v. 29, p.187-197, 2010.

SINGH, A.; LUCKI, I. Antidepressant-like activity of compounds with varying efficacy at 5-HT_{1A} receptors. **Neuropharmacology**. v.32, n.4, p.331-340, 1993.

SLUPPHAUG, G.; KAVLI, B.; KROKAN, H.E. The interacting pathways for prevention and repair of oxidative DNA damage. **Mutation Research**, v.531, n.1-2, p.231-251, 2003.

SMITH, S.R.; PROSSER, W.A.; DONAHUE, D.J.; MORGAN, M.E.; ANDERSON, C.M.; SHANAHAN, W.R. Lorcaserin (APD356), a selective 5-HT(2C) agonist, reduces body weight in obese men and women. **Obesity** (Silver Spring), v. 17, n. 3, p. 494-503, 2009.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE ENDOCRINOLOGIA E METABOLOGIA. Disponível em: <http://www.endocrino.org.br/aumento-no-caso-de-obesidade>. Acesso em: 03 fev 2014.

SOFUOGLU, M.; DUDISH-POULSEN, S.; POLING, J.; MOONEY, M.; HATSUKAMI, D.K. The effect of individual cocaine withdrawal symptoms on outcomes in cocaine users. **Addiction Behavior**, v.30, n.6, p.1125-1134, 2005.

SOOKOIAN, S. et al. Short allele of serotonin transporter gene promoter is a risk factor for **obesity** in adolescents. **Obesity** (Silver Spring), v.15, n.2, p.271-276, 2007.

SOOKOIAN, S.; GEMMA, C.; GIANOTTI, T.F.; BURGUEÑO, A.; CASTAÑO, G.; PIROLA, C.J. Genetic variants of Clock transcription factor are associated with individual susceptibility to obesity. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.87, n.6, p.1606-1615, 2008.

STANG, A.; WITTE, I. Performance of the comet assay in a high-through put version. **Mutation Research**, v. 30, n. 1-2, p. 5-10, 2009.

STEELE, K.E. et al. Alterations of central dopamine receptors before and after gastric bypass surgery. **Obesity Surgery**, v.20, n.3, p.369-374, 2010.

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

STICKEL, F.; SEITZ, H. K. The efficacy and safety of comfrey. **Public health nutrition**, v.13, n.4A, p. 501-508, 2000.

STOUT, J.C.; WEISS, J.M. An animal model for measuring behavioral responses to anxiogenic and ansiolytic manipulation. **Pharmacology Biochemistry and Behaviour**, v.47, p.459-465, 1994.

SUPLICY, H.; BOGUSZEWSKI, C.L.; DOS SANTOS, C.M.; DO DESTERRO DE FIGUEIREDO, M.; CUNHA, D.R.; RADOMINSKI, R. A comparative study of five centrally acting drugs on the pharmacological treatment of obesity. **International Journal of Obesity** (Lond), 2013. doi: 10.1038/ijo.2013.225.

TAN, X.; GROLLMAN, A.P.; SHIBUTANI, S. Comparison of the mutagenic properties of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyadenosine and 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine DNA lesions in mammalian cells. **Carcinogenesis**, v.20, n.12, p.2287-2292, 1999.

TANG, W.; WESLEY, M.; FREEMAN, W.M.; LIANG, B.; SCOTT, E. Hemby Alterations in ionotropic glutamate receptor subunits during binge cocaine self-administration and withdrawal in rats. **Journal of Neurochemistry**, v. 89, p. 1021-1033, 2004.

TAYLOR, J.L. et al. Investigating the safety of plants used in South African traditional medicine: testing for genotoxicity in the micronucleus and alkaline comet assays. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v.42, n.3, p.144-154, 2003.

TENTOLOURIS, N.; LIATIS, S.; KATSILAMBROS, N. Sympathetic system activity in obesity and metabolic syndrome. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.1083, p.129-152, 2006.

TICE, R.R. et al. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 35, n. 3, p. 206-221, 2000.

THANOS, P.K. The effects of two highly selective dopamine D3 receptor antagonists (SB-277011A and NGB-2904) on food self-administration in a rodent model of obesity. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v.89, n.4, p.499-507, 2008.

TREIT, D.; MENARD, J.; ROYAN, C. Anxiogenic stimuli in the elevated plus-maze. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v.44, n.2, p.463-469, 1993.

TSE, W.S.; BOND, A.J. Sex differences in cortisol response to reboxetine. **Journal of Psychopharmacology**, v.19, n.1, p.46-50, 2005.

TULP, O.L.; HARBI, N.A.; MIHALOV, J.; DERMARDEROSIAN, A. Effect of Hoodia plant on food intake and body weight in lean and obese LA/ Ntul//cp rats. **FASEB Journal** v.15, A404, 2001.

TUTKA, P.; BARCZYŃSKI, B.; ARENT, K.; MOSIEWICZ, J.; MRÓZ, T.; WIELOSZ, M. Different effects of nitric oxide synthase inhibitors on convulsions induced by nicotine in mice. **Pharmacological Reports**, v.59, n.3, p.259-267, 2007.

UCHINAMI, M. et al. Effect of intermittent hepatic pedicle clamping on free radical generation in the rat liver. **Surgery**, v.124, n.1, p. 49-56, 1998.

VALASSI, E.; KLIBANSKI, A.; BILLER, B.M. Clinical Review: Potential cardiac valve effects of dopamine agonists in hyperprolactinemia. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, v.95, n.3, p.1025-1033, 2010.

VAN DER KRAAIJ, A.M.; MOSTERT, L.J.; VAN EIJK, H.G.; KOSTER, J.F. Iron-load increases the susceptibility of rat hearts to oxygen reperfusion damage. Protection by the antioxidant (+)-cyanidanol-3 and deferoxamine. **Circulation**, v.78, n.2, p.442-449, 1988.

VAN HEERDEN, E.R.; HORAK, R.M.; MAHARAJ, V.J.; VLEGGAAR, R.; SENABE, J.V.; GUNNING, P.J. An appetite suppressant from *Hoodia* species. **Phytochemistry**, v.68, p.2545-2553, 2007.

VAN HEERDEN, F.R. *Hoodia gordonii*: a natural appetite suppressant. **Journal of Ethnopharmacology**. v.119, p.434-437, 2008.

VAN WANGESVELD, B.A. et al. Intrahepatic tissue pO₂ during continuous or intermittent vascular inflow occlusion in a pig liver resection model. **European Surgical Research**, v.30, n.1, p. 13-25, 1998.

VERSCHAEVE, L. et al. Investigation of the antimutagenic effects of selected South African medicinal plant extracts. **Toxicology In Vitro**. v.18, n.1, p.29-35, 2004.

VISSER, M.; BOUTER, L.M.; MCQUILLAN, G.M.; WENER, M.H.; HARRIS, T.B. Elevated C-reactive protein levels in overweight and obese adults. **JAMA**. v.282, n.22, p.2131-2135, 1999.

VOLKOW, N.D. et al. Low dopamine striatal D₂ receptors are associated with prefrontal metabolism in obese subjects: possible contributing factors. **Neuroimage**, v.42, n.4, p.1537-1543, 2008.

WANG, GENE-JACK. et al. Brain dopamine and obesity. **The Lancet**, v.357, n 3, 2001.

WARD, S.J.; LEFEVER, T.W.; JACKSON, C.; TALLARIDA, R.J.; WALKER, E.A. Effects of a Cannabinoid1 Receptor Antagonist and Serotonin2C Receptor Agonist Alone and in Combination on Motivation for Palatable Food: Dose-Addition Analysis Study in Mice. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.325, p.567-576, 2008.

WARNER, D.S.; SHENG, H.; BATINIĆ-HABERLE, I. Oxidants, antioxidants and the ischemic brain. **The Journal of Experimental Biology**, v.207, p.3221-3231, 2004.

WELLMAN, P.J. Norepinephrine and the control of food intake. **Nutrition**, v. 16, n.10, p.837-842, 2000.

WHO. **The world health report 2006**: working together for health. Geneva: World Health Organization, 2006.

WHO. World Health Organization (2011). **Obesity and overweight**: fact sheet No 311. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/index.html>. Acesso em: 04 jan 2013.

WHITTON, P.A.; LAU, A.; SALISBURY, A.; WHITEHOUSE, J.; EVANS, C. Kava lactones and the kava-kava controversy. **Phytochemistry**, v.64, n.3, p.673-9, 2003.

WILDING, J.; VAN GAAL, L.; RISSANEN, A.; VERCRUYSSSE, F.; FITCHET, M. OBES-002 Study Group. A randomized double-blind placebo-controlled study of the long-term efficacy and safety of topiramate in the treatment of obese subjects. **International journal of obesity and related metabolic disorders**, v.28, p.1399-1410, 2004.

WIRTH, A. Treatment of obesity. **Deutsche medizinische Wochenschrift**, v. 134, n. 20, p. 1074-1076, 2009.

WOOLARD, J.; BENNETT, T.; DUNN, W.R.; HEAL, D.J.; ASPLEY, S.; GARDINER, S.M. Acute cardiovascular effects of sibutramine in conscious rats. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.308, n.3, p.1102-1110, 2004.

XIAO, Y.H.; ZHAN, C.L.; LI, J.J.; WU, J.; LI, X.C.; ZHENG, W.L. Comparison of serum biochemistry between specific pathogen-free and conventional aged Wistar rats. **Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao**, v. 24, p.733-735, 2004.

YOUNG, R.; JOHNSON, D.N. A fully automated light/dark apparatus useful for comparing anxiolytic agents. **Pharmacology Biochemistry and Behaviour**, v.40, p.739-743, 1991.

A) APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA



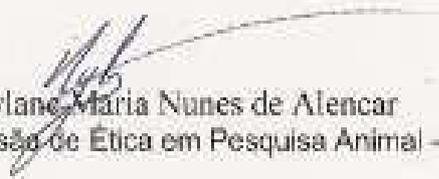
Universidade Federal do Ceará
Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA
Rua: Coronel Nunes da Melo, 1127 Rodolfo Teófilo
Cep: 60430-970 Fortaleza-CE
Tel: (85) 3366.8331 Fax: (85) 3366.8333

DECLARAÇÃO

Declaramos que o protocolo para uso de animais em experimentação nº 05/2012, sobre o projeto intitulado: **"ESTUDO DOS EFEITOS COMPORTAMENTAIS E METABÓLICOS CAUSADOS PELO USO CRÔNICO DA HOODIA GORDONII EM RATOS E CAMUNDONGOS"**, de responsabilidade de Maria do Carmo de Oliveira Cito está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Declaramos ainda que o referido projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA – em reunião realizada em 24 de maio de 2012.

Fortaleza, 20 de junho de 2012


Profa. Dra. Nylane Maria Nunes de Alencar
Coordenadora da Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA

B) ARTIGO PUBLICADO

Antidepressant-like effect of *Hoodia gordonii* in a forced swimming test in mice: evidence for involvement of the monoaminergic system

M.C.O. Clitó, M.I.G. Silva, L.K.X. Santos, M.L. Fernandes, F.H.C. Melo, J.A.C. Aguiar, I.S. Lopes, P.B. Sousa, S.M.M. Vasconcelos, D.S. Macêdo and F.C.F. Sousa

Laboratório de Neurofarmacologia, Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, Brasil

Abstract

Hoodia gordonii is a plant species used traditionally in southern Africa to suppress appetite. Recently, it has been associated with a significant increase in blood pressure and pulse rate in women, suggesting sympathomimetic activity. The present study investigated the possible antidepressant-like effects of acute and repeated (15 days) administration of *H. gordonii* extract (25 and 50 mg/kg, po) to mice exposed to a forced swimming test (FST). Neurochemical analysis of brain monoamines was also carried out to determine the involvement of the monoaminergic system on these effects. Acute administration of *H. gordonii* decreased the immobility of mice in the FST without accompanying changes in general activity in the open-field test during acute treatment, suggesting an antidepressant-like effect. The anti-immobility effect of *H. gordonii* was prevented by pretreatment of mice with PCPA [an inhibitor of serotonin (5-HT) synthesis], NAN-190 (a 5-HT_{1A} antagonist), flanserin (a 5-HT_{2A/2C} antagonist), ondansetron (a 5-HT_{3A} antagonist), prazosin (an α -1-adrenoceptor antagonist), SCH23390 (a D₁ receptor antagonist), yohimbine (an α 2-adrenoceptor antagonist), and sulpiride (a D₂ receptor antagonist). A significant increase in 5-HT levels in the striatum was detected after acute administration, while 5-HT, norepinephrine and dopamine were significantly elevated after chronic treatment. Results indicated that *H. gordonii* possesses antidepressant-like activity in the FST by altering the dopaminergic, serotonergic, and noradrenergic systems.

Key words: *Hoodia gordonii*; Antidepressant action; Monoaminergic system; Forced swimming test

Introduction

Depression is one of the most prevalent chronic neuropsychiatric disorders that affects up to 20% of the population around the globe (1). Although several classes of antidepressants are currently being used in the treatment of this disorder, because of limited efficacy and undesirable adverse effects of treatments, chronic and recurrent depression is still present at high rates. Accordingly, there is growing interest in the development of efficient and safe drugs as alternative therapeutics for the management of this mental illness (2).

Traditional medicine from around the world relies on the use of a wide variety of medicinal plants. In recent years, an increasing number of studies have demonstrated numerous plant species exhibiting a variety of promising pharmacological properties, including actions on the central nervous system (CNS), such as anxiolytic and antidepressive effects (3-5).

Hoodia gordonii (Masson) Sweet ex Decne is a cactus-like succulent species from the Apocynaceae

family used traditionally among the San tribe of southern Africa to suppress appetite when away on long hunting trips (6). This traditional use was further validated in initial exploratory research when an oxypregnane glycoside (P57) was proposed as the active compound related to weight loss induced by administration of *H. gordonii* to female rats (7). From these studies, *H. gordonii* has gained increasing interest as a natural appetite suppressant in weight management, and products containing the species have been marketed in several countries around the world. However, because of the absence of scientific evidence for its efficacy and safety, the sale of *H. gordonii* was prohibited in Brazil by the National Health Surveillance Agency in February 2007.

In a recent study, the administration of a purified extract of *H. gordonii* was associated with a significant increase in the blood pressure and pulse rate of women, suggesting possible sympathomimetic activity (8).

Correspondence: F.C.F. Sousa: <cleaflorencio@yahoo.com.br>

Received July 1, 2014. Accepted September 2, 2014. First published online November 7, 2014.

Although the effects of this plant on food intake are the focus in the literature, some sympathomimetic activity related to mood disorders could also be detected from *H. gordonii*. However, this hypothesis has still not been explored. Taking this into consideration, the present study investigated a possible antidepressant-like action of acute and chronic doses of *H. gordonii* extract administered to mice and tested in the forced swimming test (FST) (9), one of the most common animal models used for screening antidepressant drugs.

The FST is also an important tool for studying the neurobiological mechanisms involved in antidepressant responses. In fact, numerous studies have shown that the modulation of the serotonergic, noradrenergic, and dopaminergic systems in this animal model underlies the behavioral effects of several antidepressants (10,11). Thus, bearing in mind the monoaminergic theory of depression, the involvement of serotonergic, noradrenergic, and dopaminergic systems on the effects of *H. gordonii* in the FST was investigated. Furthermore, with the aim of corroborating the results from these studies, we also conducted a neurochemical analysis of brain monoamines in the animals, using high-performance liquid chromatography (HPLC).

Material and Methods

Animals

Male Swiss mice (25–30 g) maintained on a 12:12-h light-dark cycle were used in this study. All experiments were carried out at an ambient temperature of $24 \pm 2^\circ\text{C}$ with access to food and water *ad libitum*. Animals were treated in accordance with current law and the National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. The study was performed with the consent of and under surveillance by the Committee of Ethics in Animal Research (protocol #05/12) of the Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, Brazil.

Drugs

In this study, a commercial dry purified extract of *H. gordonii* was used, legally imported from Naturalmedis (UK). This product is manufactured in accordance with the requirements of the Medicines and Healthcare Products Regulatory Agency in the United Kingdom. The active ingredient content (P57) is guaranteed through regular analyses performed by the company's Laboratory for Quality Control. Also, the material was shown to be free of microbiological contamination and was at a dilution of 20:1. The purchase of the substance was made for research purposes. For the use of the drug in our experiments, *H. gordonii* was emulsified in 0.3% Tween 20 (Sigma, USA) and diluted in distilled water. The extract was administered orally to mice, at doses of 25 and 50 mg/kg in a single dose or for 15 consecutive days.

The additional drugs used in this study were: 10 mg/kg imipramine (IMI; Geisy, Brazil), 1 mg/kg prazosin (PZS; Sigma), 1 mg/kg yohimbine (YOH; Sigma), 0.05 mg/kg SCH23390 (Sigma), 50 mg/kg sulpiride (Sigma), 100 mg/kg *p*-chlorophenylalanine methyl ester (PCPA; Sigma), 0.5 mg/kg NAN-190 (1-(2-methoxyphenyl)-4-[4-(2-phthalimido)butyl]piperazine, Sigma), 1 mg/kg ondansetron (Sigma), 1 mg/kg ritanserin (Sigma), and 35 mg/kg fluoxetine (FLU; Sigma). All drugs were diluted in distilled water and administered by the intraperitoneal (*ip*) route.

FST

To investigate the effects of the drug in the FST, different groups of mice received 25 and 50 mg/kg (*po*) *H. gordonii* or vehicle (*po*) acutely for 15 consecutive days. Subsequently, 60 min after the last administration, animals were tested in the FST. IMI (10 mg/kg, *ip*) was used as the positive control.

The test was conducted using the method of Porcilt et al. (9) with minor modifications. This model is a well-known screening tool for potential antidepressant drugs: Mice were placed inside a 25-cm glass cylinder (14 cm diameter) containing 20 cm of water maintained at $24 \pm 2^\circ\text{C}$ and were forced to swim for 6 min: 2 min to adapt to the environment and 4 min to register immobility time (12,13). Their immobility time was recorded. A mouse was considered immobile when it remained floating in the water, without struggling, making only very slight movements necessary to keep its head above water. Drugs with antidepressant activity reduce that parameter (immobility time), while depressant drugs exert the opposite effect.

Because *H. gordonii* decreased the immobility of mice in the FST, the present model was also used to determine the possible involvement of the monoaminergic system on this action. Thus, to assess the possible contribution of the serotonergic system, mice were pretreated with 100 mg/kg, *ip*, PCPA, an inhibitor of serotonin (5-HT) synthesis, or vehicle, once a day, for 4 consecutive days. Then, 24 h after the last PCPA or saline injection, animals were treated with 50 mg/kg, *po*, *H. gordonii* or vehicle, and were tested in the FST 1 h later. Additional groups received 35 mg/kg, *ip*, FLU [a selective serotonin reuptake inhibitor (SSRI)] 24 h after the last PCPA or saline injection, and 30 min later were tested in the FST. Involvement of the 5-HT receptor subtypes was also investigated. Animals were pretreated with 0.5 mg/kg, *ip*, NAN-190 (a 5-HT_{1A} receptor antagonist), 1 mg/kg, *ip*, ritanserin (a 5-HT_{2A/2C} receptor antagonist), or 1 mg/kg, *ip*, ondansetron (a 5-HT_{1A} receptor antagonist), and 30 min later they received 50 mg/kg, *po*, *H. gordonii* or vehicle, and 1 h later animals were tested in the FST.

To investigate the role of the noradrenergic system on the effects of *H. gordonii*, mice were pretreated with 1 mg/kg, *ip*, prazosin (an α_1 -adrenoceptor antagonist) or 1 mg/kg, *ip*, YOH (an α_2 -adrenoceptor antagonist). Additional

groups of animals received 0.05 mg/kg, *ip*, SCH23390 (a dopamine (DA) D₁ receptor antagonist) or 50 mg/kg, *ip*, sulpiride [a DA D₂ receptor antagonist] to evaluate the dopaminergic involvement. Thirty minutes after treatments, mice received orally 50 mg/kg *H. gordonii* or vehicle, and 1 h later, they were tested in the FST.

The doses and administration schedule of the above protocols were chosen on the basis of previous study protocols, and data from the literature confirmed the selectivity and efficacy of the above-mentioned treatments at the concentrations used (14–16). Also, the observer was blinded to the treatments.

Open-field test (OFT)

To investigate general locomotor activity, mice were treated with *H. gordonii* (25 and 50 mg/kg, *po*) or vehicle (*po*) acutely or for 15 consecutive days and were exposed to the OFT 60 min after the last administration. IMI (10 mg/kg, *ip*, a classical antidepressant) was used as a positive control.

The OFT involves an apparatus made of an opaque-Plexiglas box (40 × 30 × 20 cm) with the floor divided into 9 equal squares. Each animal was gently placed in a corner of the apparatus and its behavior was observed during a 5-min session. A blind observer registered the number of times the animal entered each square (counts per 5 min), a count is considered when the animal totally crosses from one square to the next. A change in the number of counts with respect to the control group is considered as an alteration of locomotor activity (17).

Monoamine level determination

For determination of monoamine levels, control and *H. gordonii* groups (25 and 50 mg/kg) were treated acutely or for 15 consecutive days (*po*) and killed 1 h after the last treatment. The brain striatum of the mice was dissected on ice for the preparation of a 10% homogenate (10% w/v) that was sonicated in 0.1 M HClO₄ for 30 s and centrifuged at 20,375 g, for 15 min, at 4°C. Supernatants were removed and filtered through a membrane (Millipore, Brazil, 0.2 L). A 20-μL sample of the supernatant was then analyzed by HPLC (Shimadzu, Japan). Concentrations of norepinephrine (NE), DA, and serotonin (5-hydroxytryptamine or 5-HT), and their metabolites, 4-hydroxy-3-methoxy-phenylacetic acid (DOPAC), homovanillic acid (HVA), and 5-hydroxyindoleacetic acid (5-HIAA), were detected. Additionally, DA turnover is reported as the ratio of DOPAC to DA (intracellular DA

statistically significant when $P < 0.05$ compared to the control.

Results

Effect of *H. gordonii* on immobility time in the FST

Figure 1A revealed that the immobility time of animals in the FST was reduced in a significant manner after acute administration of *H. gordonii* at doses of 25 mg/kg and 50 mg/kg (H25 and H50) compared to control (df: 28; F: 13.49, $P < 0.001$). IMI-10 (10 mg/kg, *ip*) was used as the positive control and, as expected, induced similar alterations (df: 28; F: 13.49, $P < 0.001$). Figure 1B shows that animals treated for 15 consecutive days at doses of 25 mg/kg (df: 28; F: 5.36, $P < 0.05$) and 50 mg/kg (df: 28; F: 5.36, $P < 0.01$) also reduced immobility time compared to the control group. IMI-10 was once again effective as the positive control (df: 28; F: 5.36, $P < 0.01$).

Effect of *H. gordonii* on locomotion in the OFT

Figure 2A shows the results of acute treatment with *H. gordonii* in the OFT. Animals treated with the extract did not alter their locomotor activity when either dose was used compared to the control, and gave results similar to the antidepressant IMI (df: 27; F: 2.74). In Figure 2B, animals treated for 15 consecutive days presented significant reduction of locomotor activity, and IMI did not change this parameter (df: 29; F: 15.32, $P < 0.001$).

Involvement of the serotonergic, noradrenergic, and dopaminergic systems on the action of *H. gordonii* in the FST

The results presented in Figure 3A show that pretreatment of mice with the inhibitor of 5-HT synthesis PCPA (100 mg/kg, *ip*, once per day for 4 consecutive days) was able to block the effects of *H. gordonii* (H50) in the FST (df: 99; F: 9.88, $P < 0.05$). In a similar way, NAN-190 (5-HT_{1A} antagonist, 0.5 mg/kg, *ip*), ritanserin (Rit; 5-HT_{2A/2C} antagonist, 1 mg/kg, *ip*), and ondansetron (Onda; 5-HT_{3A} antagonist, 1 mg/kg, *ip*) blocked the effects of *H. gordonii* (H50) (df: 99; F: 9.88, $P < 0.05$). As expected, PCPA was able to reverse the antidepressant-like effects of FLU (35 mg/kg, *ip*) (df: 99; F: 9.88, $P < 0.05$).

Figure 3B demonstrates that pretreatment of mice with both the α1-adrenoceptor antagonist PZS-1 (mg/kg, *ip*) (df: 47; F: 7.87, $P < 0.05$) and the α2-adrenoceptor antagonist YOH-1 (mg/kg, *ip*) (df: 47; F: 7.87, $P < 0.05$)

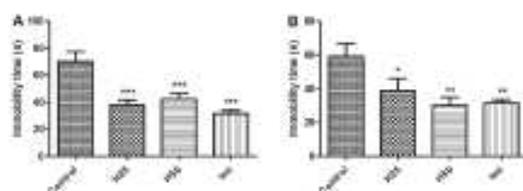


Figure 1. Immobility time in the forced swimming test of mice that received vehicle (control), *Hoodia gordonii* (25 mg/kg (H25) and 50 mg/kg (H50), po) and imipramine (IMI, 10 mg/kg, ip). Animals received *H. gordonii* acutely (A) and for 15 consecutive days (B). Results are reported as means \pm SE. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, compared to control (ANOVA and Student-Newman-Keuls *post hoc* test).

and sulpiride (50 mg/kg, ip), a DA₂ receptor antagonist (df: 47; F: 4.5, $P < 0.05$).

Effect of acute and chronic administration of *H. gordonii* on levels of brain monoamines and metabolites

Table 1 shows that animals treated with both doses of *H. gordonii* had increased serotonin levels in brain striatum, after acute (df: 20; F: 5.79, $P < 0.05$) and chronic (df: 21; F: 4.30, $P < 0.05$) treatments, compared to the respective control groups. On the other hand, only chronic administration of *H. gordonii* at 50 mg/kg induced a significant increase in the levels of NE (df: 20; F: 5.64, $P < 0.01$) and DA (df: 23; F: 3.74, $P < 0.05$).

Acute and chronic treatments with *H. gordonii* did not induce a significant change in 5-HT turnover (5-HIAA/5-HT) or intracellular (DOPAC/DA) and extracellular (HVA/DA) DA turnover, compared to the respective control groups (data not shown).

Discussion

In this study, we showed that *H. gordonii* extract at doses of 25 and 50 mg/kg, administered acutely and for 15 consecutive days by oral gavage, induced a significant antidepressant-like effect on mice tested in the FST.

The FST remains one of the most common animal models used for screening potential antidepressant agents (18,19). This test induces a state of immobility in animals facing an inescapable situation (in a swim tank). Such immobility behavior has been hypothesized to reflect behavioral despair, which in turn may reflect depressive disorders in humans. Therefore, the antidepressant-like activity of a compound is expressed by a decrease in the immobility of animals submitted to forced swimming. This behavioral change is sensitive to major classes of antidepressant drugs even when administered acutely, including monoamine oxidase inhibitors, tricyclics, selective 5-HT reuptake inhibitors, and atypicals (9,18,20). Thus, our results suggested an antidepressant-like profile

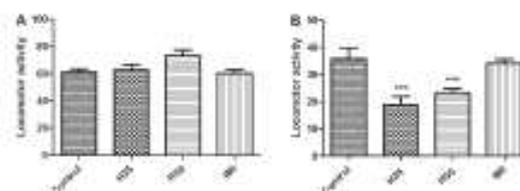


Figure 2. Locomotor activity in the open field test of mice that received saline vehicle (control), *Hoodia gordonii* (25 mg/kg (H25) and 50 mg/kg (H50), po) and imipramine (IMI, 10 mg/kg, ip). Animals received *H. gordonii* acutely (A) and for 15 consecutive days (B). Results are reported as means \pm SE. *** $P < 0.001$, compared to control (ANOVA and Student-Newman-Keuls *post hoc* test).

from *H. gordonii*, also shown by known antidepressant drugs in clinical use, such as FLU, IMI, and others (9,20,21).

Previous studies have shown that CNS stimulant drugs, such as cocaine or amphetamines, are able to decrease immobility in the FST. However, in contrast to antidepressants, stimulant drugs cause marked motor stimulation in tests that evaluate the general activity of animals. As such, this behavior profile is consistent with a false positive effect in the FST model and is often distinguished from the antidepressant-like reduction in immobility by assessing locomotor activity in the OFT (9,21). Thus, to investigate the possibility that *H. gordonii* reduced immobility by a stimulant action, mice were assessed for the ability to increase motor activity in the OFT. This experiment is a common measure of exploratory behavior and general activity in both mice and rats, and therefore it has been frequently used as a mechanism to assess sedative, toxic, or stimulant effects of compounds (22).

Our findings showed that, similar to IMI (10 mg/kg), acute administration of *H. gordonii* at both doses tested (25 and 50 mg/kg) did not produce significant changes in locomotion of the animals in the open-field arena. However, there was a tendency toward an increase in locomotion at a higher dose (50 mg/kg). These results indicated that *H. gordonii* exerted a probable antidepressant-like effect in the FST at relatively low doses. Thus, further investigation is required to investigate a possible increase in ambulation using higher doses of *H. gordonii*. Similar behavioral changes can be observed for instance from bupropion, an effective DA reuptake inhibitor antidepressant used in clinical practice, which induces locomotion in animals only at high doses (23).

For the chronic treatment, mice treated with *H. gordonii* at both doses, for 15 days consecutively, exhibited decreased locomotor activity in the OFT, whereas 10 mg/kg IMI was not able to change this parameter. Previous studies have demonstrated a similar decrease in locomotor activity from different antidepressants in the OFT, including acute and chronic IMI at doses

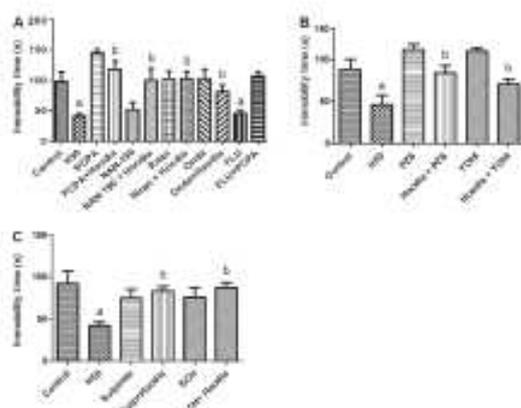


Figure 3. Effects of *Hoodia gordonii* in the forced swimming test on serotonergic, noradrenergic and dopaminergic systems. **A**, Pretreatment of animals with *p*-chlorophenylalanine methyl ester (PCPA, 100 mg/kg, *ip*), itanserin (Itan, 1 mg/kg, *ip*), ondansetron (Onda, 1 mg/kg, *ip*) or vehicle on the effects of *H. gordonii* (H50, 50 mg/kg, *po*). Fluoxetine (Flu, 35 mg/kg, *ip*) was used as positive control. **B**, Pretreatment of animals with prazosin (PZS, 1 mg/kg, *ip*) or yohimbine (YOH, 1 mg/kg, *ip*), and **C**, with sulpiride (50 mg/kg) and SCH23390 (0.05 mg/kg) or vehicle on the effects of *H. gordonii* (50 mg/kg, *po*). Results are reported as means \pm SE. * $P < 0.05$, compared to control; ** $P < 0.05$ compared to *H. gordonii* (ANOVA and Student-Newman-Keuls *post hoc* test).

as high as 20 or 30 mg/kg (21,24). Despite the decrease in locomotor activity in the open field, immobility behavior was decreased in the FST, suggesting that such effects from *H. gordonii* treatments were not due to an increase in locomotor activity of the mice. Taken together, our results in the FST and OFT suggest that *H. gordonii* at relatively low doses may act as an antidepressant-like agent.

The monoamine hypothesis of depression predicts that the underlying pathophysiological basis of depression

is, at least in part, a depletion in the levels of 5-HT, NE, and/or DA in the CNS. This hypothesis appears to be supported by the mechanism of action of antidepressant drugs, which elevate the levels of these neurotransmitters in the brain. Because the FST also provides a useful model for investigating neurobiological mechanisms underlying antidepressant-like responses (25), the involvement of serotonergic, noradrenergic, and dopaminergic systems on the effects of *H. gordonii* was also investigated using this test. With this aim, we investigated the effects of several pharmacological antagonists/modulators of these systems on the anti-immobility action of *H. gordonii* in mice.

Most antidepressant drugs in clinical use promote an increase in 5-HT availability by directly inhibiting serotonin reuptake, affecting serotonin turnover in the brain, and also interacting with 5-HT_{1A}, 5-HT₂, and 5-HT_{2A} receptors (26,27). In this sense, studies show that PCPA (an inhibitor of tryptophan hydroxylase) administered to mice or rats for 4 consecutive days is able to deplete the endogenous stores of 5-HT (by about 60%) and prevent the antidepressant-like effect of 5-HT reuptake inhibitors (SSRIs) like FLU in the FST (28), consistent with the hypothesis that SSRI compounds elicit their acute behavioral effects by increasing extracellular 5-HT. In the present study, the reduction of brain 5-HT by pretreatment of mice with PCPA prevented the antidepressant-like effect of *H. gordonii*, suggesting that the mechanism underlying its effect is possibly dependent on an increase in 5-HT levels in the synaptic cleft. Participation of the serotonergic system is reinforced by demonstrating that the effects of *H. gordonii* were also reversed by pretreatment with 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A/2C}, and 5-HT_{2A} receptor antagonists, suggesting a probable involvement of these receptors in its antidepressant-like activity.

In parallel with the serotonergic system, the noradrenergic system is also strongly implicated in the pathophysiology of depression (29). At least in part, depression

Table 1. Determination of levels of monoamines and metabolites in striatum of mice treated with *Hoodia gordonii*, using high performance liquid chromatography (HPLC).

Monoamines and metabolites	Acute treatment			Chronic treatment		
	Control	H25	H50	Control	H25	H50
NE	2.59 \pm 0.48	4.46 \pm 0.43	3.38 \pm 0.73	2.80 \pm 1.10	2.41 \pm 0.98	7.67 \pm 0.86**
DA	5.21 \pm 0.77	4.27 \pm 0.99	5.44 \pm 1.09	4.66 \pm 0.91	5.46 \pm 0.88	7.61 \pm 0.50*
HVA	5.53 \pm 1.08	3.69 \pm 0.65	2.59 \pm 0.24	1.88 \pm 0.30	2.22 \pm 0.67	3.32 \pm 0.54
DOPAC	3.76 \pm 0.90	2.50 \pm 0.21	3.17 \pm 0.34	3.38 \pm 0.41	3.48 \pm 0.48	3.92 \pm 0.89
5HT	2.60 \pm 0.87	6.83 \pm 1.12*	5.76 \pm 0.63*	1.78 \pm 0.20	5.17 \pm 1.11*	4.43 \pm 0.89*
5HIAA	5.05 \pm 1.01	5.07 \pm 1.37	3.62 \pm 0.91	4.02 \pm 1.24	3.58 \pm 1.15	3.54 \pm 1.47

Animals received acute and chronic (15-days) administration of *H. gordonii* (25 and 50 mg/kg, *po*, H25 and H50, respectively) or vehicle. Data are reported as means \pm SE in nmo/g tissue ($n = 7-8$). NE: noradrenaline; DA: dopamine; DOPAC: 3,4-dihydroxyphenylacetic acid; 5HT: serotonin; 5HIAA: 5-hydroxy-3-indoleacetic acid; HVA: homovanilic acid. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$, compared to control. (one-way ANOVA and Student-Newman-Keuls *post hoc* test).

seems to also be associated with a hypofunction of the noradrenergic system, so that some antidepressants act by increasing the synaptic availability of NE (26). In this context, the α 1- and α 2-adrenoceptors have been shown to underlie some of the antidepressant-like responses of drugs in behavioral models of depression (29,30). Our results showed that pretreatment of mice with both prazosin and YOH (α 1- and α 2-adrenoceptor antagonists, respectively) was able to reverse the antidepressant-like effect of *H. gordonii*. These findings indicated that the effect of *H. gordonii* in the FST involved, at least in part, an interaction with α 1- and α 2-adrenoceptors, suggesting the participation of the noradrenergic system in the antidepressant-like action induced by this plant extract.

Studies show that the dopaminergic system, in part, may also be implicated in the regulation of mood (31). Currently, there is evidence from several reports regarding the efficacy of antidepressants related to the potentiation of dopaminergic neurotransmission in the treatment of depression (31,32). Our results showed that the dopaminergic system was also involved in the anti-immobility effect of *H. gordonii* through an interaction with both DA D₁ and D₂ receptors, because pretreatment of the mice with SCH23390 (a DA D₁ receptor antagonist) or sulpiride (a DA D₂ receptor antagonist) prevented the anti-immobility effect evoked by *H. gordonii*. These results are in accordance with previous studies, which have reported that the anti-immobility effect of tricyclic antidepressants such as IMI (and others) was related, at least in part, to D₂ receptors (32). Additionally, although the role of DA D₁ receptors in the action mechanism of antidepressants is still controversial, several studies have also shown their involvement in depression and on the action mechanism of antidepressants (33).

Together, behavioral changes evoked by *H. gordonii* in the FST suggested an antidepressant-like effect after acute and repeated administration of the plant extract, which seem to be mediated by an interaction with the serotonergic, noradrenergic, and dopaminergic systems. Thus, in order to corroborate these findings, we additionally quantified monoamine (5-HT, NE, and DA) and metabolite (DOPAC, HVA, and 5-HIAA) levels in brain striatum of mice that received acute and chronic (15 days) treatment with *H. gordonii* (25 and 50 mg/kg, po). Although hippocampus, hypothalamus, and cortex areas have been strongly related to the antidepressant mechanism of several drugs (34), studies show that the striatum is also a relevant brain area involved in the action of these compounds (35,36). For instance, Kreiss and Lucki (35) showed that acute and repeated administration of FLU (an SSRI) elevated the levels of 5-HT in the striatum of rats, while Ichikawa and Meltzer (36) showed that IMI (a tricyclic) significantly increased extracellular DA in the striatum.

Consistent with previous studies that show a strong relationship between the mechanism of antidepressants and changes in striatal monoamine levels, the present neurochemical analysis conducted by HPLC revealed significant increased levels of monoamines in brain striatum of mice treated with *H. gordonii*. Results showed that only 5-HT monoamine was significantly increased after acute administration of *H. gordonii*, at both doses tested, while an increase of all three monoamines (5-HT, DA, and NE) was observed after chronic administration at 50 mg/kg. These results corroborated our hypothesis that the antidepressant-like effect exhibited by *H. gordonii* extract in the FST is, indeed, related to the serotonergic, noradrenergic, and dopaminergic systems.

More specifically, our findings showed that the effects of *H. gordonii* are dependent on increases in 5-HT, NE, and DA levels in the synaptic cleft, mainly after repeated administration at higher doses, suggesting that neuronal adaptive changes may develop following long-term treatment that sustain higher levels of NE and DA than can be achieved following acute administration. In addition, elevated NE levels detected in this study are in accordance with previous reports that associate *H. gordonii* to significant increases in blood pressure and pulse rate (6). However, it must be emphasized that only one discrete brain region was examined in this study and it is quite possible that functional changes occur at other sites.

In summary, the present study provided evidence indicating that acute and chronic (15 days) oral administration of *H. gordonii* extract at doses of 25 and 50 mg/kg exhibited a probable antidepressant-like effect in mice exposed to the FST. This action was not related to a psychostimulant effect in the OFT. Furthermore, behavioral alterations observed in the FST and OFT seem to be mediated, at least in part, by an interaction with the serotonergic, noradrenergic, and dopaminergic systems, including increases in monoamine (5-HT, NE, and DA) levels in the striatum of mice. Our results raise the perspective for further investigation on behavioral changes and neurochemical mechanisms involved in antidepressant-like effects elicited by *H. gordonii*. However, because the present results were obtained using a dry extract of the plant at a dilution of 20:1 and the substances contained in this extract were not used in the vehicle groups, future research is also required to confirm the present effects.

Acknowledgments

The authors are grateful to CNPq and CAPES for financial support.

References

- Wong ML, Lidrio J. Research and treatment approaches to depression. *Nat Rev Neurosci* 2001; 2: 343-351, doi: 10.1038/35072566.
- Tran PV, Bymaster FP, McNamara RK, Potter WZ. Dual monoamine modulation for improved treatment of major depressive disorder. *J Clin Psychopharmacol* 2003; 23: 78-86, doi: 10.1097/J00004714-200302000-00011.
- Dhingra D, Valecha R. Evidence for involvement of the monoaminergic system in antidepressant-like activity of an ethanolic extract of *Boerhaavia diffusa* and its isolated constituent, punarnavina, in mice. *Pharm Biol* 2014; 52: 767-774, doi: 10.3109/13880209.2013.870583.
- Teixeira CP, de Melo CT, de Araujo FL, de Carvalho AM, Silva MI, Barbosa-Filho JM, et al. Antidepressant-like effect of ripsarin II from *Aniba riparia* in mice: evidence for the involvement of the monoaminergic system. *Fundam Clin Pharmacol* 2013; 27: 129-137, doi: 10.1111/j.1472-8206.2011.00973.x.
- Bhattacharya SK, Bhattacharya A, Saitam K, Ghosal S. Anxiolytic-antidepressant activity of *Withania somnifera* glycowithanolides: an experimental study. *Phytomedicine* 2000; 7: 463-469, doi: 10.1016/S0944-7113(00)00306-6.
- van Heerden FR. *Hoodia gordonii*: a natural appetite suppressant. *J Ethnopharmacol* 2008; 119: 434-437, doi: 10.1016/j.jep.2008.08.023.
- van Heerden FR, Marthinus HR, Maharaj VJ, Vieggaar R, Senabe JV, Gunning PJ. An appetite suppressant from *Hoodia* species. *Phytochemistry* 2007; 68: 2545-2553, doi: 10.1016/j.phytochem.2007.05.022.
- Biom WA, Abrahamse SL, Bradford R, Duchateau GS, Theis W, Orsi A, et al. Effects of 15-d repeated consumption of *Hoodia gordonii* purified extract on satiety, ad libitum energy intake, and body weight in healthy, overweight women: a randomized controlled trial. *Am J Clin Nutr* 2011; 94: 1171-1181, doi: 10.3945/ajcn.111.020321.
- Porcett RD, Berlin A, Jaffe M. Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 1977; 229: 327-336.
- Chen PJ, Hsieh CL, Su KP, Hou YC, Chiang HM, Sheen LY. Rhizomes of *Gastrodia elata* B(L) possess antidepressant-like effect via monoamine modulation in subchronic animal model. *Am J Chin Med* 2009; 37: 1113-1124, doi: 10.1142/S0192415X09007533.
- Cryan JF, Markou A, Lucki I. Assessing antidepressant activity in rodents: recent developments and future needs. *Trends Pharmacol Sci* 2002; 23: 239-245, doi: 10.1016/S0165-6147(02)02017-5.
- de Amaral JF, Silva MI, de Aquino Neto MR, Moura BA, de Carvalho AM, Vasconcelos PF, et al. Antidepressant-like effect of bis-eugenol in the mice forced swimming test: evidence for the involvement of the monoaminergic system. *Fundam Clin Pharmacol* 2013; 27: 471-482, doi: 10.1111/j.1472-8206.2012.01058.x.
- Einat H, Clenet F, Shaldubina A, Belmaker RH, Bourtin M. The antidepressant activity of inositol in the forced swim test involves 5-HT₂ receptors. *Behav Brain Res* 2001; 118: 77-83, doi: 10.1016/S0166-4328(00)00314-4.
- Machado DG, Kaster MP, Binfante RW, Dias M, Santos AR, Pizzolatti MG, et al. Antidepressant-like effect of the extract from leaves of *Boerhaavia diffusa* in mice: evidence for the involvement of the monoaminergic system. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2007; 31: 421-428, doi: 10.1016/j.pnpbp.2006.11.004.
- Posser T, Kaster MP, Barauna SC, Rocha JB, Rodrigues AL, Leal RB. Antidepressant-like effect of the organoselenium compound ebselein in mice: evidence for the involvement of the monoaminergic system. *Eur J Pharmacol* 2009; 602: 85-91, doi: 10.1016/j.ejphar.2008.10.055.
- Melo CT, de Carvalho AM, Moura BA, Teixeira CP, Vasconcelos LF, Feitosa ML, et al. Evidence for the involvement of the serotonergic, noradrenergic, and dopaminergic systems in the antidepressant-like action of ripsarin III obtained from *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae) in mice. *Fundam Clin Pharmacol* 2013; 27: 104-112, doi: 10.1111/j.1472-8206.2011.00968.x.
- Archer J. Tests for emotionality in rats and mice: a review. *Anim Behav* 1973; 21: 205-235, doi: 10.1016/S0003-3472(73)90065-X.
- Petit-Demouliere B, Chenu F, Bourtin M. Forced swimming test in mice: a review of antidepressant activity. *Psychopharmacology* 2005; 177: 245-255, doi: 10.1007/s00213-004-2048-7.
- Silva MI, de Aquino Neto MR, Teixeira Neto PF, Moura BA, de Amaral JF, de Sousa DP, et al. Central nervous system activity of acute administration of isopulegol in mice. *Pharmacol Biochem Behav* 2007; 88: 141-147, doi: 10.1016/j.pbb.2007.07.015.
- Porsolt RD, Bertin A, Jaffe M. "Behavioural despair" in rats and mice: strain differences and the effects of imipramine. *Eur J Pharmacol* 1978; 51: 291-294, doi: 10.1016/0014-2999(78)90414-4.
- Relaey HEL, Amri HS. Effects of antidepressants on behavioral assessment in adolescent rats. *Bahrain Med Bull* 2014; 33: 1-12.
- Walsh RN, Cummins RA. The Open-Field Test: a critical review. *Psychol Bull* 1978; 83: 482-504, doi: 10.1037/0033-2909.83.3.482.
- Nielsen JA, Shannon NJ, Bert L, Moore KE. Effects of acute and chronic bupropion on locomotor activity and dopaminergic neurons. *Pharmacol Biochem Behav* 1986; 24: 795-799, doi: 10.1016/0091-3057(86)90413-2.
- Reus GZ, Abelaira HM, dos Santos MA, Cattesi AS, Tomaz DB, Neotti MV, et al. Ketamine and imipramine in the nucleus accumbens regulate histone deacetylation induced by maternal deprivation and are critical for associated behaviors. *Behav Brain Res* 2013; 256: 451-456, doi: 10.1016/j.bbr.2013.08.041.
- Cardoso CC, Lobato KR, Binfante RW, Ferreira PK, Rosa AO, Santos AR, et al. Evidence for the involvement of the monoaminergic system in the antidepressant-like effect of magnesium. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2009; 33: 235-242, doi: 10.1016/j.pnpbp.2008.11.007.
- Ethwaege AS. Central monoamines and their role in major depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2004; 28: 435-451, doi: 10.1016/j.pnpbp.2004.03.001.
- Stahl SM, Lee-Zimmerman C, Cartwright. Serotonergic drugs for depression and beyond. *Curr Drug Targets* 2013; 14: 578-585, doi: 10.2174/13894501131413141314

<http://dx.doi.org/10.1016/j.pnpbp.2013.08.041>

28. O'Leary OF, Bechtholt AJ, Crowley JJ, Hill TE, Page ME, Lucki I. Depletion of serotonin and catecholamines block the acute behavioral response to different classes of antidepressant drugs in the mouse tail suspension test. *Psychopharmacology* 2007; 192: 357-371, doi: 10.1007/s00213-007-0728-9.
29. Kitada Y, Miyauchi T, Kanazawa Y, Nakamichi H, Satoh S. Involvement of alpha- and beta 1-adrenergic mechanisms in the immobility-reducing action of desipramine in the forced swimming test. *Neuropharmacology* 1983; 22: 1055-1060, doi: 10.1016/0026-3908(83)90024-2.
30. Stone EA, Grunewald GL, Lin Y, Ahsan R, Rosengarten H, Kramer HK, et al. Role of epinephrine stimulation of CNS alpha1-adrenoceptors in motor activity in mice. *Synapse* 2003; 49: 67-76, doi: 10.1002/syn.10212.
31. D'Aquila PS, Colu M, Gessa GL, Serra G. The role of dopamine in the mechanism of action of antidepressant drugs. *Eur J Pharmacol* 2000; 405: 365-373, doi: 10.1016/S0014-2999(00)00566-5.
32. Dziedzicka-Wasylewska M, Kolasiewicz W, Rogoz Z, Margas W, Maj J. The role of dopamine D2 receptor in the behavioral effects of imipramine - study with the use of antisense oligonucleotides. *J Physiol Pharmacol* 2000; 51: 4014-09.
33. Yamada J, Sugimoto Y, Yamada S. Involvement of dopamine receptors in the anti-immobility effects of dopamine re-uptake inhibitors in the forced swimming test. *Eur J Pharmacol* 2004; 504: 207-211, doi: 10.1016/j.ejphar.2004.09.057.
34. Butterweck V, Bockers T, Korte B, Wittkowski W, Winterhoff H. Long-term effects of St. John's wort and hypericin on monoamine levels in rat hypothalamus and hippocampus. *Brain Res* 2002; 930: 21-29, doi: 10.1016/S0006-8993(01)03394-7.
35. Kreiss DS, Lucki I. Effects of acute and repeated administration of antidepressant drugs on extracellular levels of 5-hydroxytryptamine measured *in vivo*. *J Pharmacol Exp Ther* 1995; 274: 866-876.
36. Ichikawa J, Meltzer HY. Effect of antidepressants on striatal and accumbens extracellular dopamine levels. *Eur J Pharmacol* 1995; 281: 255-261, doi: 10.1016/0014-2999(95)00264-L.