



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**

**FACULDADE DE MEDICINA**

**DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

**JOÃO HENRIQUE CHAVES**

**Efeito tipo antidepressivo e ansiolítico do extrato etanólico de *egletes viscosa* e de seu metabólito Conizaleucolideo A: Envolvimento de mecanismos monoaminérgicos, antioxidantes e anti-inflamatórios**

**FORTALEZA-CE**

**2016**

**EFEITO TIPO ANTIDEPRESSIVO E ANSIOLÍTICO DO EXTRATO ETANÓLICO DE  
*Egletes viscosa* E DE SEU METABÓLITO CONIZALEUCOLIDEO A: ENVOLVIMENTO  
DE MECANISMOS MONOAMINÉRGICOS, ANTIOXIDANTES E ANTI-  
INFLAMATÓRIOS**

Resultados da tese apresentada 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.

Orientadora: Profa. Dra. Danielle Macêdo Gaspar

**FORTALEZA-CE**

**JOÃO HENRIQUE CHAVES**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

- C438e Chaves, João Henrique.  
Efeito tipo antidepressivo e ansiolítico do extrato etanólico de egletes viscosa e de seu metabólito  
Conizaleucolideo A : Envolvimento de mecanismos monoaminérgicos, antioxidantes e anti-inflamatórios /  
João Henrique Chaves. – 2016.  
158 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação  
em Farmacologia, Fortaleza, 2016.  
Orientação: Prof. Dr. Danielle Macêdo Gaspar .  
Coorientação: Prof. Dr. Maria Rose Jane Ribeiro Albuquerque.
1. Depressão. 2. Ansiedade. 3. Produtos naturais. I. Título.

CDD 615.1

---

**EFEITO TIPO ANTIDEPRESSIVO E ANSIOLÍTICO DO EXTRATO ETANÓLICO DE *Egletes viscosa* E DE SEU METABÓLITO CONIZALEUCOLIDEO A: ENVOLVIMENTO DE MECANISMOS MONOAMINÉRGICOS, ANTIOXIDANTES E ANTI-INFLAMATÓRIOS**

Esta tese foi submetida como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor em Farmacologia, outorgado pela Universidade Federal do Ceará

Aprovada em : 05/08/2016

**BANCA EXAMINADORA**

---

**Profa. Dra. Danielle Macêdo Gaspar (Orientadora)**

**Universidade Federal do Ceará**

---

**Profa. Dra. Edna Maria Camelo Chaves**

**Universidade Estadual do Ceará**

---

**Prof. Dr. Cícero Francisco Bezerra de Felipe**

**Universidade Federal da Paraíba**

---

**Prof. Dr. José Eduardo Ribeiro Honório Júnior**

**UNICHRISTUS**

---

**Profa. Dra. Maria Rose Jane Ribeiro Albuquerque**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL VALE DO ACARAÚ**

*Dedico essa tese aos meus pais,*

*família e amigos*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, por ter me permitido fazer parte dessa grande família que é o Laboratório de Neurofarmacologia da UFCE.

À minha família, que me deu a base para conseguir chegar até aqui.

Aos meus colegas de laboratório, que me ajudaram de todas as formas. Sem eles certamente não teria conseguido os resultados alcançados.

À minha orientadora, que me auxiliou em todos os momentos dessa jornada, e que me inspirou e inspira a sempre buscar o melhor no campo profissional e pessoal.

À todos os professores do grupo de pesquisa do Laboratório de Neurofarmacologia e aos membros das bancas de qualificação e defesa pelo carinho e atenção para com o trabalho realizado.

À CAPES pelo apoio financeiro.

À Universidade Federal do Ceará, por fazer parte da minha vida desde a graduação, mestrado e agora concedendo-me o título de Doutor.

**A todos o meu muito obrigado!**

## RESUMO

### EFEITO TIPO ANTIDEPRESSIVO E ANSIOLÍTICO DO EXTRATO ETANÓLICO DE *Egletes viscosa* E DE SEU METABÓLITO CONIZALEUCOLÍDEO A: ENVOLVIMENTO DE MECANISMOS MONOAMINÉRGICOS, ANTIOXIDANTES E ANTI-INFLAMATÓRIOS

A espécie *Egletes viscosa*, da família Asteraceae, é uma erva silvestre frequente no sertão e litoral nordestino do Brasil, popularmente designada por macela verdadeira. A planta apresenta como principais usos problemas digestivos e intestinais, cólicas, gases, azia, má digestão, diarreia e enxaqueca. Estudos prévios levaram a relacionar possíveis efeitos centrais a esta espécie vegetal. Visando a busca por melhores alternativas terapêuticas para tratamentos de depressão e ansiedade em humanos, avaliou-se seus possíveis efeitos centrais nos modelos pré-clínicos em camundongos. Foram utilizados modelos clássicos de triagem para agentes sedativo/hipnótico e antidepressivos, como o campo aberto (CA), *rota rod* (RR), Labirinto em cruz elevado ou *plus maze* (LCE), nado forçado (TNF) e preferência por sacarose (PS). Para esse estudo, utilizou-se o extrato etanólico nas doses de 100 e 200 mg/kg, além do constituinte majoritário isolado desse extrato, um diterpeno furânico denominado colizaleucolídeo A (CZA), nas doses de 25 e 50 mg/kg. No modelo do LCE demonstrou-se que as drogas apresentaram atividade ansiolítica com envolvimento do receptor benzodiazepínico, pois o efeito foi revertido pelo Flumazenil. Posteriormente, foram realizados testes de avaliação do efeito antidepressivo com dois modelos comportamentais, o TNF e PS, sendo a depressão induzida pela administração intraperitoneal de LPS 0,5 mg/kg. Através desses modelos, foi observado um efeito antidepressivo não relacionado a ação psicoestimulante, e que parece ser mediado, pelo menos em parte, por uma interação com os sistemas dopaminérgico (receptores D<sub>1</sub> e D<sub>2</sub>), noradrenérgico (receptor  $\alpha_1$ ) e serotoninérgico (receptores 5-HT<sub>1A</sub>). Também foi analisado o efeito anti-inflamatório e antioxidante, sabidamente relacionados à fisiopatologia da depressão. Usando o lipopolissacarídeo como indutor do estado depressivo, o mesmo atuou alterando os níveis de nitrito, espécies reativas de ácido tiobarbitúrico (TBARS), da enzima mieloperoxidase (MPO), bem como reduzindo os níveis de glutathiona reduzida (GSH), efeitos condizentes com o estado depressivo. Verificou-se a atuação dos materiais extraídos de *E. viscosa* na prevenção e na reversão de alterações no córtex pré-frontal, hipocampo e núcleos da base de camundongos conseguiu reverter os efeitos do Lipopolissacarídeo nos parâmetros estudados. Foi utilizada a imipramina na dose de 10 mg/kg como droga padrão tanto na prevenção quanto na reversão do estado depressivo em animais. Os dados obtidos sugerem efeito antidepressivo do extrato etanólico de *E. viscosa* assim como seu constituinte majoritário, CZA.

Palavras-chave: Lipopolissacarídeo. *Egletes viscosa*. Ansiedade. Depressão.

## ABSTRACT

### ANTIDEPRESSANT AND ANXIOLYTIC LIKE EFFECT OF ETHANOLIC EXTRACT OF *Egletes viscosa* AND ITS METABOLITE CONYZALEUCOLIDE A: INVOLVEMENT OF MONOAMINE, ANTIOXIDANTS AND ANTI- INFLAMMATORY MECHANISMS

The *Egletes viscosa* specie, from Asteraceae family, is a common wild grass in the wilderness and the northeastern coast of Brazil, popularly known as true macela. The plant has as main uses digestive and intestinal problems, cramps, gas, heartburn, indigestion, diarrhea and headache. Previous studies have led to relate possible central effects of this plant species. Aiming to search for better therapeutic alternatives for treatment of depression and anxiety in humans, it evaluated its possible central effects in preclinical models of mice. Classic models were used in screening for sedative / hypnotic and antidepressant agents, such as the open field (CA), *rota rod* (RR), plus maze (LCE), forced swimming test (TNF) and suppression of sucrose (SC). For the study, we used the ethanolic extract at doses of 100 and 200 mg / kg, besides the isolated major constituent of this extract, a diterpene furan called colizaleucólídeo A, at doses of 25 and 50 mg / kg. It has been shown that drugs presented anxiolytic and antidepressant activity. A target site to the related anxiolytic effects is the GABA receptor, which was shown in the plus maze test with the GABA antagonist flumazenil. Following, evaluation tests of antidepressant effect with two behavioral models were performed, the forced swimming test (TNF) and the suppression of sucrose (SC), having de LPS (lipopolysaccharide) intraperitoneal as the inducer of similar to depression behaviour. Through these models, it was observed an antidepressant effect not related to psychostimulant actions, and that seems to be mediated, at least in part by an interaction with the dopaminergic system (D1 and D2 receptors), noradrenergic (receptor  $\alpha_1$ ) and serotonin (receptor 5-HT<sub>1A</sub>). It was also analyzed the anti-inflammatory and antioxidant effects, known to be related to the pathophysiology of depression. Using lipopolysaccharide as an inducer of the depressive state, it changed the nitrite levels, reactive thiobarbituric acid (TBARS), the enzyme myeloperoxidase (MPO) as well as reduced the levels of reduced glutathione (GSH), all the effects consistent with the depressive state. The performance of the materials extracted from *E. viscosa* was found in the prevention and reversal of changes in the prefrontal cortex, hippocampus and nucleus of base, where it could reverse the effects of lipopolysaccharide in the studied parameters. Imipramine was used as a standard drug both in prevention and in reversing the depressive state in animals. The data suggest the use of *E. viscosa* ethanol extract and the diterpene colizaleucólídeo A as antidepressant.

Keywords: Lipopolysaccharide. *Egletes viscosa*. Anxiety. Depression.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1	Circuitos neuronais da ansiedade e medo	26
FIGURA 2	Ansiedade patológica: hiperativação de circuitos ligados à amígdala	27
FIGURA 3	Receptor GABA <sub>A</sub> .	29
FIGURA 4	Correspondência entre sintomas depressivos e circuitos	31
FIGURA 5	Esquema da composição do LPS na parede celular de bactérias gram-negativas.	43
FIGURA 6	Mecanismo de ação simplificado do LPS em um macrófago, culminando com a liberação de citocinas pró-inflamatórias:	45
FIGURA 7	Fotografia de <i>Egletes viscosa</i> Less, mostrando folhas e capítulos florais.	51
FIGURA 8	Capítulos florais de <i>E.viscosa</i> Less.	52
FIGURA 9	Espectro de RMN <sup>1</sup> H do Conizaleucolídeo A (CZA)	65
FIGURA 10	Espectro de RMN <sup>13</sup> C do Conizaleucolídeo A (CZA)	66
FIGURA 11	Estrutura química e fórmula molecular do diterpeno conizaleucolídeo A (CZA)	66
FIGURA 12	Efeito dos extratos etanólico (EE) e do diterpeno conizaleucolídeo A (CZA), via oral, sobre a atividade locomotora espontânea no teste do campo aberto	81
FIGURA 13	Efeito dos extratos etanólico (EE) e do diterpeno conizaleucolídeo A (CZA), sobre o número de <i>rearing</i> no teste do campo aberto	81

FIGURA 14	Efeito dos extratos etanólico (EE) e do diterpeno conizaleucolídeo A (CZA), sobre o número de <i>grooming</i> no teste do campo aberto	81
FIGURA 15	Efeito dos extratos etanólico (EE) e do diterpeno conizaleucolídeo A (CZA), sobre o tempo de permanência no Teste do Rota Rod	83
FIGURA 16	Efeito do extrato etanólico de <i>E. viscosa</i> e do conizaleucolídeo A, via oral, sobre o número de entradas nos braços abertos (NEBA)	86
FIGURA 17	Efeito do extrato etanólico de <i>E. viscosa</i> e do conizaleucolídeo A, via oral, sobre o tempo de permanência nos braços abertos (TPBA) no teste do labirinto em cruz elevado	87
FIGURA 18	Efeito do extrato etanólico de <i>E. viscosa</i> e do conizaleucolídeo A via oral, sobre a porcentagem do tempo de permanência nos braços abertos (PTPA) no teste do labirinto em cruz elevado	88
FIGURA 19	Efeito do tratamento de camundongos pré-tratados (A) e pós-tratados (B) sobre a redução do tempo de imobilidade induzida pelo tratamento com o extrato etanólico (100 e 200 mg / kg, v.o.) e com o diterpeno furânico CZA (50 mg / kg, v.o) no teste do nado forçado, antes e após aplicação do Lipopolissacarídeo (LPS)	89
FIGURA 20	Efeito do pré-tratamento de camundongos com AMS (100 mg / kg, i.p.) (A) ou SCH23390 (15 ug / kg, i.p.) (B) sobre a redução do tempo de imobilidade induzida pelo tratamento com o extrato etanólico (100 e 200 mg / kg, v.o.) e com o diterpeno furânico CZA (50 mg / kg, v.o) no teste do nado forçado	91
FIGURA 21	Efeito do pré-tratamento de camundongos com PSZ (1 mg/kg, i.p.) (A) ou IMB (1mg/kg, i.p.) (B) sobre a redução do tempo de imobilidade induzida pelo tratamento com o extrato etanólico (100 e 200 mg / kg, v.o.) e com o diterpeno furânico CZA (50 mg / kg, v.o) no teste do nado forçado.	93
FIGURA 22	Efeito do pré-tratamento de camundongos com PCPA (100 mg/kg, i.p.) (A) ou NAN-190 (0,5 mg/kg, i.p.) (B) sobre a	95

redução do tempo de imobilidade induzida pelo tratamento com o extrato etanólico (100 e 200 mg / kg, v.o.) e com o diterpeno furânico CZA (50 mg / kg, v.o) no teste do nado forçado.

- FIGURA 23 Efeito do extrato etanólico de *E. viscosa* e do conizaleucolídeo A via oral, sobre a porcentagem do consumo de solução de sacarose sobre água pura no teste de preferência por sacarose com administração de LPS antes e depois da administração das drogas. 98
- FIGURA 24 Níveis de glutathiona reduzida do córtex pré-frontal de camundongos pré-tratados (A) e pós-tratados(B) com o extrato etanólico (100 e 200 mg / kg, v.o.) e com o diterpeno furânico CZA (50 mg / kg, v.o) no teste do nado forçado, antes (pré) e após (pós) aplicação do Lipopolissacarídeo (LPS). 100
- FIGURA 25 Níveis de glutathiona reduzida do hipocampo de camundongos pré-tratados (A) e pós-tratados(B) com o extrato etanólico (100 e 200 mg / kg, v.o.) e com o diterpeno furânico CZA (50 mg / kg, v.o) no teste do nado forçado, antes e após aplicação do Lipopolissacarídeo (LPS). 102
- FIGURA 26 Níveis de glutathiona reduzida dos núcleos da base de camundongos pré-tratados (A) e pós-tratados(B) com o extrato etanólico (100 e 200 mg / kg, v.o.) e com o diterpeno furânico CZA (50 mg / kg, v.o) no teste do nado forçado, antes e após aplicação do Lipopolissacarídeo (LPS). 104
- FIGURA 27 Níveis de espécies reativas do ácido tiobarbitúrico(TBARS) do córtex pré-frontal de camundongos pré-tratados (A) e pós-tratados(B) com o extrato etanólico (100 e 200 mg / kg, v.o.) e com o diterpeno furânico CZA (50 mg / kg, v.o) no teste do nado forçado, antes e após aplicação do Lipopolissacarídeo (LPS). 106
- FIGURA 28 Níveis de espécies reativas do ácido tiobarbitúrico(TBARS) do hipocampo de camundongos pré-tratados (A) e pós-tratados(B) com o extrato etanólico (100 e 200 mg / kg, v.o.) e com o diterpeno furânico CZA (50 mg / kg, v.o) no teste do nado forçado, antes e após aplicação do Lipopolissacarídeo (LPS). 108

FIGURA 29	Níveis de espécies reativas do ácido tiobarbitúrico(TBARS) do núcleo da base de camundongos pré-tratados (A) e pós-tratados(B) com o extrato etanólico (100 e 200 mg / kg, v.o.) e com o diterpeno furânico CZA (50 mg / kg, v.o) no teste do nado forçado, antes e após aplicação do Lipopolissacarídeo	110
FIGURA 30	Níveis de mieloperoxidase (MPO) do córtex pré-frontal de camundongos pré-tratados (A) e pós-tratados(B) com o extrato etanólico (100 e 200 mg / kg, v.o.) e com o diterpeno furânico CZA (50 mg / kg, v.o) no teste do nado forçado, antes e após aplicação do Lipopolissacarídeo (LPS).	112
FIGURA 31	Níveis de mieloperoxidase (MPO) do hipocampo de camundongos pré-tratados (A) e pós-tratados(B) com o extrato etanólico (100 e 200 mg / kg, v.o.) e com o diterpeno furânico CZA (50 mg / kg, v.o) no teste do nado forçado, antes e após aplicação do Lipopolissacarídeo (LPS)	114
FIGURA 32	Níveis de mieloperoxidase (MPO) dos núcleos da base de camundongos pré-tratados (A) e pós-tratados(B) com o extrato etanólico (100 e 200 mg / kg, v.o.) e com o diterpeno furânico CZA (50 mg / kg, v.o) no teste do nado forçado, antes e após aplicação do Lipopolissacarídeo (LPS).	116
FIGURA 33	Níveis de nitrito do córtex pré-frontal de camundongos pré-tratados (A) e pós-tratados(B) com o extrato etanólico (100 e 200 mg / kg, v.o.) e com o diterpeno furânico CZA (50 mg / kg, v.o) no teste do nado forçado, antes e após aplicação do Lipopolissacarídeo (LPS).	118
FIGURA 34	Níveis de nitrito do hipocampo de camundongos pré-tratados (A) e pós-tratados(B) com o extrato etanólico (100 e 200 mg / kg, v.o.) e com o diterpeno furânico CZA (50 mg / kg, v.o) no teste do nado forçado, antes e após aplicação do Lipopolissacarídeo (LPS).	120
FIGURA 35	Níveis de nitrito do núcleo da base de camundongos pré-tratados (A) e pós-tratados (B) com o extrato etanólico (100 e 200 mg / kg, v.o.) e com o diterpeno furânico CZA (50 mg / kg, v.o) no teste do nado forçado, antes e após aplicação do Lipopolissacarídeo (LPS).	122

## LISTA DE QUADROS

QUADRO 1	Vias de sinalização, localização e farmacologia de subtipos de receptor NA	34
QUADRO 2	Vias de sinalização, localização e farmacologia de subtipos de receptor 5-HT	35
QUADRO 3	Receptores dopaminérgicos	36
QUADRO 4	Drogas e Reagentes	62
QUADRO 5	Equipamentos	63
QUADRO 6	Esquema demonstrativo da administração das drogas	68
QUADRO 7	Esquema do Teste do Campo Aberto	70
QUADRO 8	Esquema do Teste do do <i>Rota Rod</i>	71
QUADRO 9	Cálculo dos parâmetros PEBA e PTBA do LCE	72
QUADRO 10	Esquema do Teste do Labirinto em Cruz Elevado.	73
QUADRO 11	Esquema do Teste do Teste do Nado Forçado	75

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Classificação dos terpenóides	53
----------	-------------------------------	----

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-HT	Serotonina
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CZA	Colizaleucolídeo A
DA	Dopamina
DSM-IV	Diagnóstico e Estatística de Desordens Mentais IV
EDTA	ácido dissódico etilenodiaminotetracético
EE	Extrato etanólico de <i>Egletes viscosa</i>
EP	erro padrão
FDA U.S.	<i>Food and Drug Administration</i>
GABA	Ácido gama-aminobutírico
GAPDH	<i>Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase</i>
GSH	Glutationa redutase
HPA	Hipotálamo-pituitária-adrenal
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
IMB	Iombina
i.p.	Intraperitoneal
LCE	Labirinto em cruz elevado ou <i>plus maze</i>
LPS	lipopolissacarídeo
MPO	Mieloperoxidase
NA	Noradrenalina
NaCl	Cloreto de sódio
NEBA	Número de entradas nos braços abertos
NO	Óxido nítrico
PCPA	p-cloro-fenil-alanina

PCR	Reação em cadeia da polimerase
PSZ	Prasozina
PTPA	Porcentagem do tempo de permanência nos braços abertos
RMN <sup>1</sup> H	Ressonância Magnética Nuclear do Hidrogênio
RMN <sup>13</sup> C	Ressonância Magnética Nuclear do Carbono-13
RR	<i>Rota rod</i>
SAL+LPS	Salina com LPS
SNC	Sistema nervoso central
TBARS	Espécies reativas do ácido tiobatbitúrico
TNF	Teste do Nado forçado
TPBA	Tempo de permanência nos braços abertos
v.o	Via oral



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	22
1.1 Problemática dos transtornos mentais	22
1.2 Ansiedade	23
1.3 Depressão	30
1.3.1 Receptores monoaminérgicos	33
1.3.2 Hipótese inflamatória e neurodegenerativa da depressão	37
1.4 Lipopolissacarídeo	42
1.4.1 Mecanismo de ação do lipopolissacarídeo	44
1.5 O poder terapêutico dos produtos naturais	46
1.5.1 Considerações botânicas	49
1.5.2 Terpenos	52
1.5.3 Diterpeno conizaleucolídeo A	55
<b>2 RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA</b>	57
<b>3 OBJETIVOS</b>	60
3.1 Objetivo geral	60
3.2 Objetivo específico	61

<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>62</b>
4.1 Extração e isolamento do diterpeno Conizaleucolídeo A	64
4.2 Animais	67
4.3 Preparo das drogas	67
4.4 Tratamento dos grupos experimentais	67
4.5 Protocolo experimental	69
4.6 Avaliação da atividade ansiolítica	69
4.6.1 Teste do campo aberto	69
4.6.2 Teste do <i>Rota Rod</i>	70
4.6.3 Teste do Labirinto em Cruz Elevado (LCE)	71
4.7 Avaliação da Atividade Antidepressiva	74
4.7.1 Teste do Nado Forçado	74
4.7.2 Investigação de possíveis mecanismos relacionados ao efeito antidepressivo do extrato etanólico e do conizaleucolídeo A no teste do nado forçado.	74
4.7.3 Preferência de sacarose	74
4.8 Determinações neuroquímicas	74
4.8.1 Determinação dos níveis de Glutathiona Reduzida (GSH)	76
4.8.2 Níveis de espécies reativas de ácido tiobarbitúrico (TBARS)	76

4.9	Determinação da resposta inflamatória	77
4.9.1	Ensaio da mieloperoxidase (MPO)	77
4.9.2	Ensaio de nitritos	77
4.10	Análise estatística	78
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>80</b>
5.1	Avaliação da Atividade Motora e Ansiolítica	80
5.1.1	Teste do Campo Aberto	80
5.2	Avaliação da Atividade Relaxante Muscular	82
5.2.1	Teste do <i>Rota Rod</i>	82
5.3	Avaliação da Atividade Ansiolítica	84
5.3.1	Labirinto em cruz elevado ou <i>plus maze</i> (LCE)	84
5.4	Avaliação da Atividade Antidepressiva	88
5.4.1	Teste do nado forçado (TNF)	88
5.4.1.1	Envolvimento do sistema dopaminérgico	91
5.4.1.2	Envolvimento do sistema noradrenérgico	93
5.4.1.3	Envolvimento do sistema serotoninérgico	95
5.4.2	Teste da preferência de sacarose	96
5.4.3	Avaliação do estresse oxidativo e da resposta inflamatória	99

5.4.3.1 Determinação dos níveis de glutathiona reduzida (GSH)	99
5.4.3.1.1 Determinação dos níveis de glutathiona reduzida (GSH) do córtex pré-frontal no pré e pós-tratamento com o extrato etanólico de <i>E. viscosa</i> e com o diterpeno CZA.	99
5.4.3.1.2 Determinação dos níveis de glutathiona reduzida (GSH) do hipocampo no pré e pós-tratamento com o extrato etanólico de <i>E. viscosa</i> e com o diterpeno CZA.	101
5.4.3.1.3 Determinação dos níveis de glutathiona reduzida (GSH) dos núcleos da base no pré e pós-tratamento com o extrato etanólico de <i>E. viscosa</i> e com o diterpeno CZA.	103
5.4.3.2.1 – Determinação dos níveis de espécies reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS) do córtex pré-frontal de camundongos no pré e pós tratamento com o extrato etanólico de <i>E. viscosa</i> e com o diterpeno CZA.	105
5.4.3.2.2 – Determinação dos níveis de espécies reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS) do hipocampo de camundongos no pré e pós tratamento com o extrato etanólico de <i>E. viscosa</i> e com o diterpeno CZA.	107
5.4.3.2.3 – Determinação dos níveis de espécies reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS) dos núcleos da base de camundongos no pré e pós tratamento com o extrato etanólico de <i>E. viscosa</i> e com o diterpeno CZA.	109
5.4.3.3 – Determinação dos níveis de Mieloperoxidase	111
5.4.3.3.1 – Determinação dos níveis da enzima mieloperoxidase (MPO) no córtex pré-frontal de camundongos no pré e pós-tratamento com o extrato etanólico de <i>E. viscosa</i> e com o diterpeno CZA.	111
5.4.3.3.2 – Determinação dos níveis da enzima mieloperoxidase	

(MPO) no hipocampo de camundongos no pré e pós-tratamento com o extrato etanólico de <i>E. viscosa</i> e com o diterpeno CZA.	113
5.4.3.3.3 – Determinação dos níveis da enzima mieloperoxidase (MPO) nos núcleos da base de camundongos no pré e pós-tratamento com o extrato etanólico de <i>E. viscosa</i> e com o diterpeno CZA.	115
5.4.3.4 Determinação dos níveis de nitrito	117
5.4.3.4.1 Determinação dos níveis de nitrito do córtex pré-frontal no pré e pós-tratamento com o extrato etanólico de <i>E. viscosa</i> e com o diterpeno CZA.	117
5.4.3.4.2 Determinação dos níveis de nitrito do hipocampo no pré e pós tratamento com o extrato etanólico de <i>E. viscosa</i> e com o diterpeno CZA.	119
5.4.3.4.3 Determinação dos níveis de nitrito dos núcleos da base no pré e pós-tratamento com o extrato etanólico de <i>E. viscosa</i> e com o diterpeno CZA.	122
<b>6 DISCUSSÃO</b>	124
<b>7 CONCLUSÕES</b>	135
<b>REFERÊNCIAS</b>	

## ***INTRODUÇÃO***

---

---

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Problemática dos transtornos mentais

A conscientização de que os transtornos mentais representam um sério problema de saúde pública é relativamente recente, ocorrendo a partir de publicação realizada pela Organização Mundial da Saúde e por pesquisadores da Escola de Saúde Pública da Universidade de Harvard, em 1994 (LOPEZ; MURRAY, 1998). Utilizando como medida uma combinação do número de anos vividos com incapacidade, conseqüente deterioração da qualidade de vida, e do número de anos perdidos por morte prematura causada pela doença (medidos pela unidade *Disability Adjusted Life Years* – DALYs), verificou-se que doenças como transtornos depressivos e transtornos cardiovasculares estão rapidamente substituindo a desnutrição, complicações perinatais e doenças infectocontagiosas em países subdesenvolvidos, onde vivem quatro quintos da população do mundo (ANDRADE, 2006).

Transtornos mentais comuns estão associados com deficiência, mau prognóstico de doenças de comorbidade e impactos sobre os custos de saúde e produtividade econômica. Uma proporção significativa da carga global de saúde é atribuível à saúde mental (WHO, 2008). Problemas de saúde mental grave contribuem com 21,5% de toda a incapacitação decorrente de doenças (DALY) no Brasil (WHO,2010; SCHRAMM, 2004) . Recente pesquisa epidemiológica com adultos na cidade de São Paulo mostrou uma prevalência anual de 19,9% para transtornos de ansiedade, 11% para transtornos do humor, como a depressão, 4,3% para os transtornos de controle de impulso e de 3,6 % para abuso de substâncias. Estes dados revelam o impacto causado pelos problemas de saúde mental na vida do indivíduo bem como na economia, resultante da incapacitação laboral daqueles acometidos pelos transtornos (GONÇALVES, 2014).

## 1.2 Ansiedade

A palavra ansiedade provém do termo grego *anshein*, que significa estrangular, sufocar, oprimir. O termo correlato, angústia, origina-se de duas palavras latinas: *angere* (causar pânico) e *angor* (opressão ou falta de ar). Tais palavras indicam estreitamento ou constrição. Todos esses termos referem-se, metaforicamente, à experiência subjetiva característica da ansiedade (STORCH, 2013).

É caracterizada como uma emoção difusa e desagradável que faz parte da reação de sobrevivência evolutiva de “luta e fuga”, sendo desencadeada em situações de ameaça (KEELEY; STORCH, 2009; STAHL, 2010); é um sentimento comum e muito frequente em todos os seres humanos e útil para a sobrevivência e proteção do indivíduo. A definição de tal sentimento pode, muitas vezes, ser fornecida através de metáforas, dificultando definições precisas a respeito do objeto estudado (CARVALHO, 2006). A ansiedade é definida como um estado emocional desagradável, que produz desconforto e muitas queixas. o fenômeno é complexo e envolve várias estruturas do encéfalo. Dentre as estruturas envolvidas, a amígdala representa a estrutura chave do fenômeno, visto que a hiperatividade dos circuitos ligados a ela determina o surgimento dos sintomas ansiosos (STAHL, 2010).

Até o final do século XIX os distúrbios de ansiedade raramente eram encarados como problemas médicos. No século XIX Sigmund Freud estabeleceu o conceito de neurose, distinguindo a neurose crônica dos ataques de ansiedade, além de notar associação entre estes e a agorafobia (PROVENSI, 2007).

Do ponto de vista evolutivo, a ansiedade e o medo, assim como o estresse, têm suas raízes nas reações de defesa dos animais, que ocorrem em resposta aos perigos encontrados em seu meio ambiente. Quando um animal se depara com uma ameaça ao seu bem estar, à sua integridade física, ou até mesmo à sua sobrevivência, ele experimenta uma série de respostas comportamentais e neurovegetativas, que caracterizam a reação de medo (MARGINS, 2003). Porém, esse mecanismo pode perder a capacidade de auto-regulação transformando-se assim, em um distúrbio de ansiedade. (KIM; GORMAN, 2005).



Segundo o DSM-V da Associação Americana de Psiquiatria (2013) e o CID-10 da Organização Mundial de Saúde (2008), os principais transtornos de ansiedade são:

- Agorafobia – ansiedade ou hesitação para com lugares ou situações de onde a fuga pode ser difícil ou embaraçosa, ou aonde o socorro pode não ser possível.
- Fobia social – Ansiedade intensa provocada pela exposição a certas situações sociais ou de desempenho, geralmente levando a comportamentos de hesitação.
- Fobias específicas – Ansiedade intensa provocada pela exposição a determinados objetos ou situações temidas, geralmente levando a comportamentos de hesitação.
- Transtorno de ansiedade generalizada – ansiedade ou preocupação excessiva e persistente com duração maior de seis meses.
- Transtorno do pânico – frequentes ataques de pânico com início súbito e sem causa aparente, consistindo em sentimentos de intenso terror, com palpitações, sudorese, tremores, faltam de ar, dor no peito, náusea, sensação de formigamento, e até sensação de morte eminente.
- Transtorno do estresse pós-traumático – sentimento de reviver um acontecimento extremamente traumático acompanhado por sintomas de aumento do estado de alerta e de hesitação à fatores associados ao trauma.
- Transtorno obsessivo-compulsivo – obsessões que podem causar intensa ansiedade ou perturbações e/ou compulsões que servem para neutralizar a ansiedade.

Dentre as desordens citadas, o transtorno de ansiedade generalizada (TAG) é a mais comum, atingindo 11,5% dos atendimentos (SCHMIDT, 2010). É importante ressaltar o alto grau de comorbidade entre os diferentes subtipos de ansiedade e outras desordens psiquiátricas, particularmente os distúrbios de humor. Um estudo americano revelou que 66,3% dos pacientes com diagnóstico de transtorno de ansiedade generalizada também sofriam de pelo menos um outro distúrbio psiquiátrico, sendo a maior associação verificada com a depressão (38,6%) (NUTT *et al*, 2006).

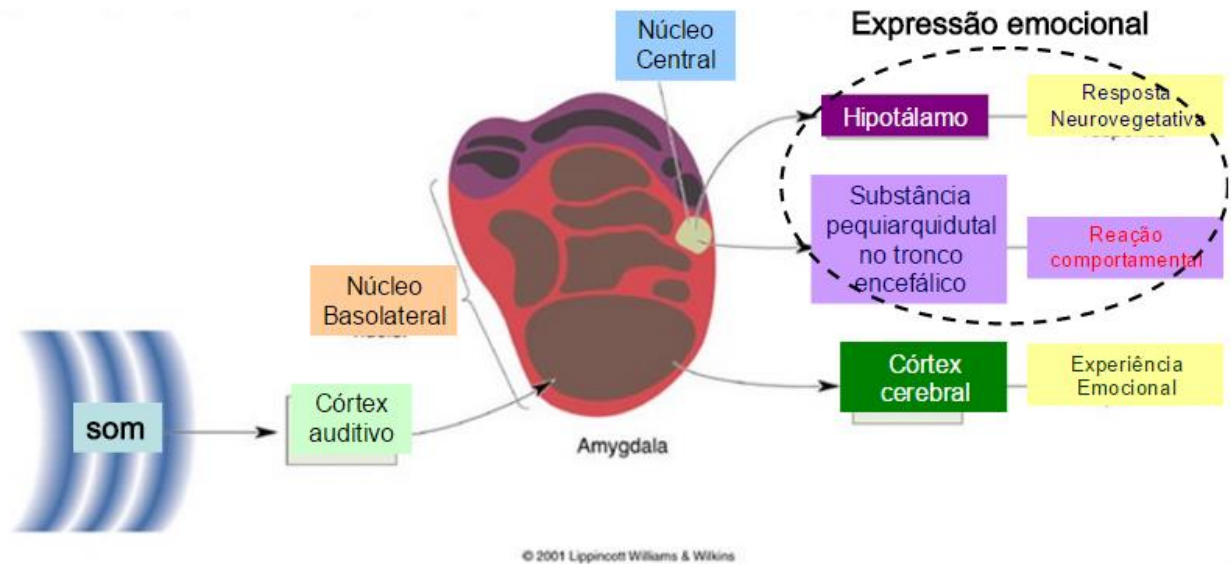
Apesar de possuírem aspectos clínicos distintos, os transtornos de ansiedade aparentemente possuem uma base neural semelhante, algumas vezes podendo ser explicados como o resultado de uma redução na sinalização inibitória mediada pelo ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) (CRESTANI *et al.*, 1999), porém, apenas esta hipótese não explica totalmente a complexidade destes transtornos.

As informações sensoriais chegam à amígdala através de projeções aferentes provenientes do tálamo, córtex e hipocampo, e nela as informações sensoriais são processadas em seus diferentes núcleos, partindo do núcleo lateral para o basolateral até alcançar o núcleo central, sua principal via de saída. Os neurônios eferentes partem do núcleo central da amígdala em direção a diferentes áreas cerebrais responsáveis pela geração de respostas fisiológicas, comportamentais, autonômicas e hormonais relacionadas à ansiedade (BRANDÃO, 2008) (**Figura 1, pág. 26**). As conexões entre a amígdala, o córtex orbitofrontal e o cíngulo anterior regulam a resposta emocional (sentimento de medo), enquanto que as conexões entre a amígdala e a área cinzenta periaquedutal do tronco cerebral regulam as respostas motoras associadas ao medo que podem ser de luta, fuga ou congelamento (STAHL, 2010).

As reações endócrinas, por sua vez, (como, por exemplo, a elevação dos níveis de cortisol) são devidas as conexões entre a amígdala e o hipotálamo, enquanto que o aumento da frequência respiratória e as respostas autonômicas (como, por exemplo, o aumento da frequência cardíaca e da pressão arterial) são mediadas, respectivamente, por conexões entre a amígdala e o núcleo parabraquial no tronco cerebral e entre a amígdala e o *locus coeruleus* (onde se concentram corpos celulares noradrenérgicos). A ansiedade pode também ser desencadeada por memórias contidas no hipocampo através de suas conexões com a amígdala (STAHL, 2010).

**Figura 1** - Circuitos neuronais da ansiedade e medo

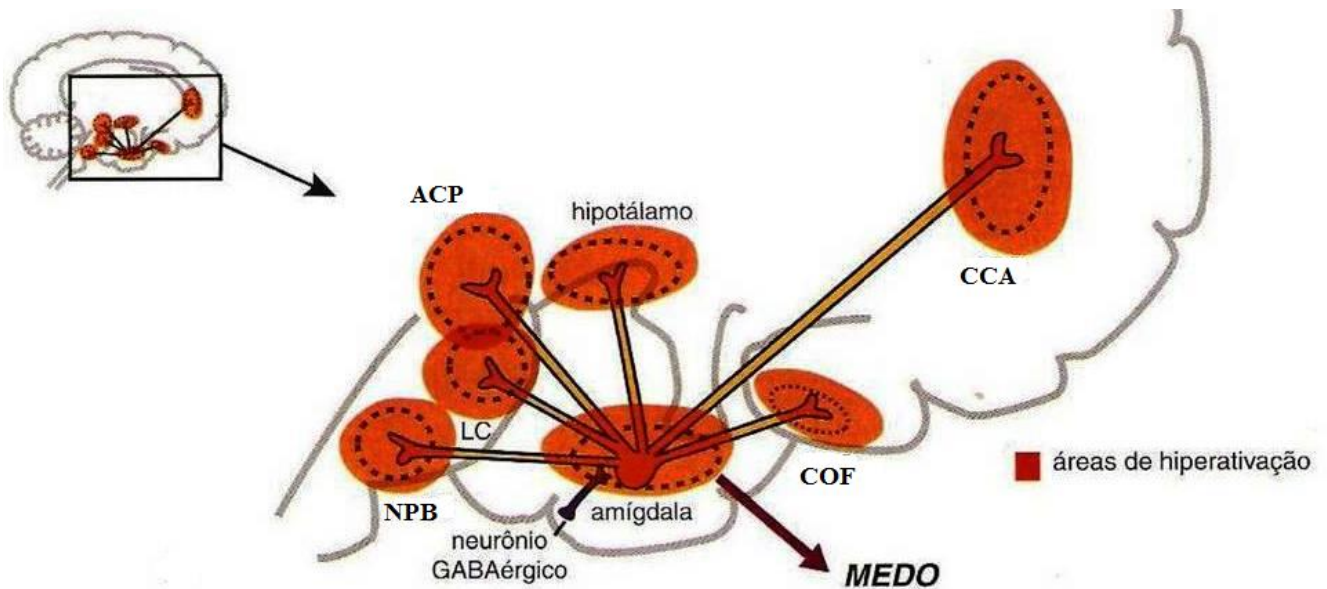
**Circuito neural para o medo aprendido e ansiedade**



**Fonte:** Adaptado de BRANDÃO, 2008.

A ativação excessiva dos circuitos ligados à amígdala pode desencadear a ansiedade patológica em várias circunstâncias (BRANDÃO, 2008). Sabe-se que as alterações nesses circuitos têm origem neuroquímica, estando associadas com um estado de excessiva excitabilidade do SNC e/ ou prejuízos dos sistemas GABAérgicos, serotoninérgicos e noradrenérgicos, entre outros (CALINE; MENDES, 2011) (**Figura 2, pág. 27**).

**Figura 2** - Ansiedade patológica: hiperativação de circuitos ligados à amígdala



**Fonte:** STAHL et al, 2010. Nota: Siglas: CCA: córtex cingulado anterior; COF: córtex orbitofrontal; ACP: área cinzenta paraquedutal do tronco cerebral; LC: *lócus coeruleus*; NPB: núcleo parabraquial.

O indivíduo, durante a reação de luta-e-fuga, também tem sua transpiração aumentada e há redução da atividade do sistema digestivo (causando náuseas, sensação de peso no estômago, constipação ou diarreia) e sintomas de tensão, que podem acarretar dores (BARLOW, 1999). A ansiedade também envolve a mudança na atenção do indivíduo, deixando-o alerta para qualquer ameaça em potencial no ambiente. Dessa forma, pessoas ansiosas têm dificuldade para se focar em uma única tarefa, qualquer alteração no ambiente tira sua concentração. Indivíduos ansiosos são distraídos, possuem dificuldade de concentração e problemas de memória. Além da distração, essas pessoas também têm a precisão de seus movimentos prejudicada, já que, na ansiedade, as vias neurais se ocupam com impulsos de alerta do sistema de luta-e-fuga, fazendo com que decresça ou iniba os impulsos precisos que compõem o movimento coordenado (BARLOW, 1999; ROMAN & SAVOIA, 2003).

No tocante ao tratamento, a farmacoterapia combinada à psicoterapia são formas efetivas de controle. No caso de transtornos generalizados de ansiedade, fobia social e síndrome do pânico são amplamente prescritos os benzodiazepínicos com o intuito de suprimir a excitabilidade neuronal em áreas cerebrais chaves (CALINE; MENDES, 2011).

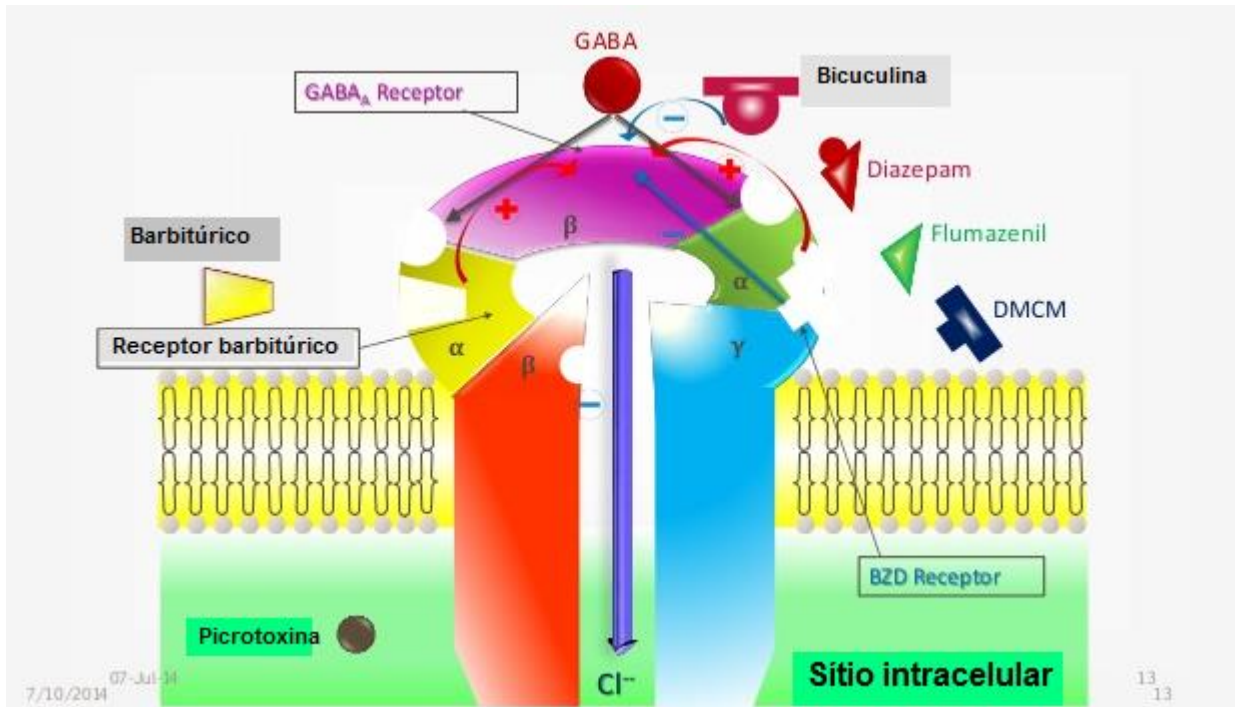
Os benzodiazepínicos se ligam a receptores benzodiazepínicos no canal GABA<sub>A</sub> modulando alostericamente este canal na amígdala e no córtex pré-frontal nas alças CSTC. O GABA é o principal neurotransmissor inibitório do Sistema Nervoso Central. No núcleo dorsal da rafe, exerce uma inibição tônica sobre os neurônios serotoninérgicos. Na MCP e colículos superiores, exerce um controle inibitório sobre o substrato neural do medo. No teto mesencefálico, controla aspectos motores relacionados ao comportamento de fuga. Os receptores benzodiazepínicos e o GABA estão presentes em toda parte no SNC, afetando diversos sistemas funcionais. Entretanto, os sistemas neuronais envolvidos na regulação da ansiedade, segundo evidências experimentais, são particularmente os núcleos lateral e baso-lateral da amígdala, os quais são ricos em receptores benzodiazepínicos. Estudos mostram também que o sistema GABA – benzodiazepínico da amígdala regula não apenas a ansiedade, mas a memória emocional, já que à amígdala também é atribuída a ação amnésica dos compostos benzodiazepínicos (ZANGROSSI; HETEM; GRAEFF, 1997).

O GABA é sintetizado a partir do glutamato utilizando a enzima L-ácido glutâmico descarboxilase e a Vitamina B6 como cofator. Este processo converte o principal neurotransmissor excitatório (glutamato) em um inibitório. Como citado anteriormente, o GABA é considerado o principal neurotransmissor inibitório no SNC de vertebrados tendo sua ação mediada pelos receptores GABA<sub>A</sub>, GABA<sub>B</sub> e GABA<sub>C</sub> (STAHL, 2010). Os receptores GABA<sub>A</sub> são canais iônicos sensíveis a ligantes, com estrutura pentamérica em cujo centro há um canal de cloreto. Tipos diferentes de isoformas (subunidades) ( $\alpha_{1-6}$ ,  $\beta_{1-3}$ ,  $\gamma_{1-3}$ ,  $\rho_{1-3}$ ,  $\theta$ ,  $\epsilon$ ,  $\pi$ ,  $\delta_{1-3}$ ) podem se combinar para formar um receptor deste tipo, portanto há muitos subtipos diferentes de receptor GABA A, dependendo das subunidades presentes (ALLEN *et al.*, 2009).

A atividade do receptor GABA<sub>A</sub> é mediada por um grande número de ligantes químicos, que atuam em diferentes sítios do receptor (GALOFRÉ *et al.*, 2010). Sabe-se que os receptores GABA<sub>A</sub> sensíveis aos benzodiazepínicos devem apresentar duas subunidades  $\beta$  e a subunidade  $\gamma_2$  ou  $\gamma_3$ , e duas unidades  $\alpha$ , do subtipo  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  ou  $\alpha_3$  e têm localização pós-sináptica (STAHL, 2010). Após ligar-se à região entre as subunidades  $\gamma_{2/3}$  e  $\alpha_{1/2/3}$ , os benzodiazepínicos aumentam a afinidade entre o GABA e seu receptor e medeiam um tipo de inibição no neurônio pós-sináptico que é fásica, ocorrendo em surtos de inibição desencadeados por concentrações máximas de

GABA liberado na sinapse. Supostamente a combinação de benzodiazepínicos e GABA aumenta a frequência de abertura dos canais de cloro inibitórios (STAHL, 2010) (**Figura 3**).

**Figura 3** - Receptor GABA<sub>A</sub>.



Fonte: Adaptado de <https://www.xbrain.co.uk/alpha-brain-ingredientsgaba>.

Conforme dito anteriormente, nem todos os receptores do tipo GABA<sub>A</sub> são iguais. Aqueles sensíveis aos benzodiazepínicos com subunidades  $\alpha_1$  são mais importantes para a regulação do sono e são alvos de drogas hipnótico-sedativas. Por outro lado, os com subunidades  $\alpha_2$  e/ou  $\alpha_3$  parecem ser os mais importantes para a regulação da ansiedade e são os alvos presumíveis dos ansiolíticos benzodiazepínicos. Os benzodiazepínicos disponíveis atualmente, porém, não são seletivos para receptores GABA<sub>A</sub> com subunidades diferentes. Há, no entanto, pesquisa contínua de drogas seletivas  $\alpha_{2/3}$  que podem ser utilizadas no tratamento de transtornos de ansiedade em seres humanos. Essas drogas seriam teoricamente ansiolíticas sem ser sedativas. Os agonistas parciais seletivos para subunidades  $\alpha_{2/3}$  causariam, hipoteticamente, menos euforia,

menos reforço e seriam menos passíveis de abuso, causariam menos dependência e menos problemas quanto a interrupção (STAHL, 2010).

### 1.3 Depressão

Dos transtornos de humor o mais comum é a depressão. A depressão é hoje a doença mental mais comum do mundo, afetando mais de 121 milhões de pessoas e, além disso, estima-se que em aproximadamente uma década ela se torne a segunda doença responsável pela perda prematura de vida entre todas as idades e sexos. (WHO, 2012).

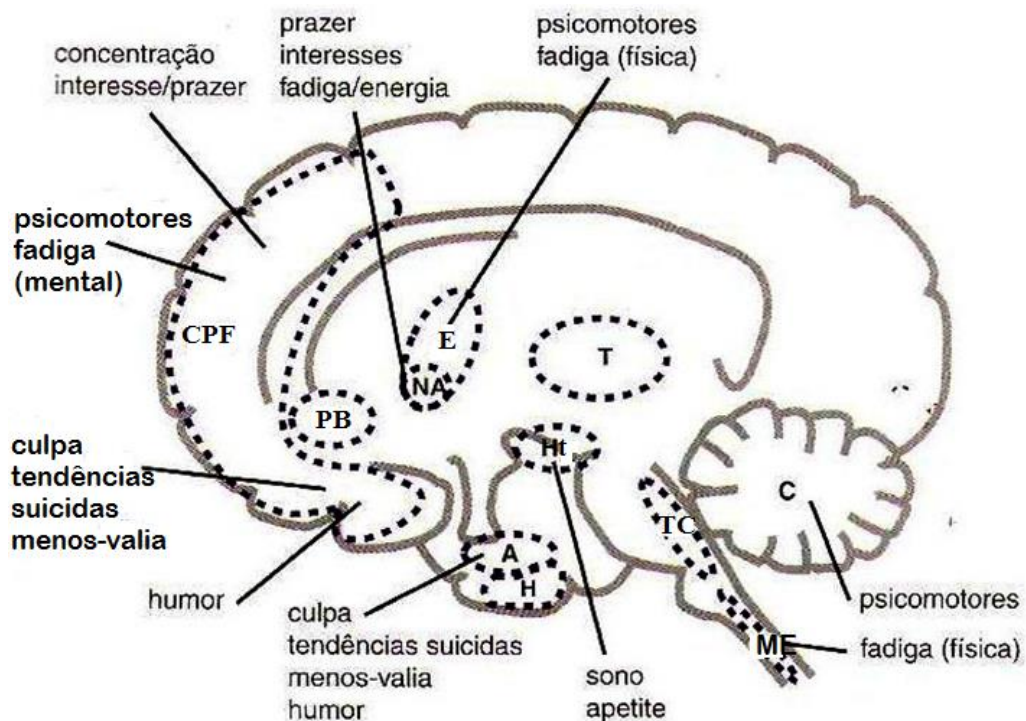
A depressão é uma doença de curso crônico e recorrente, debilitante e que apresenta uma alta incidência e prevalência (GALDINO *et al.*, 2009). A prevalência na população geral para transtornos depressivos tem alcançado números entre 4% e 10%, sendo observada uma maior incidência em mulheres, variando de 10% a 25%, enquanto nos homens a porcentagem é de 5% a 12%. Outro dado importante é que uma a cada 20 pessoas é atingida por um episódio depressivo durante o curso da vida, e em cada 50 casos diagnosticados com a patologia, um necessita de internação, e 15% dos deprimidos graves cometem suicídio. Segundo a Organização Mundial de Saúde houve um aumento vertiginoso dos casos da doença a partir da segunda metade do século XIX (CUNHA *et al.*, 2012).

Os principais sintomas clínicos da depressão são: anorexia, anedonia, perda de peso, fadiga, letargia, distúrbios do sono, hiperalgesia, sentimento de culpa, redução da atividade locomotora, falta de concentração e idéias suicidas. A característica essencial do comportamento depressivo é a presença de humor deprimido caracterizado por sentimentos de tristeza, desamparo, e/ou perda de interesse ou prazer em quase todas as atividades, durante um período de pelo menos duas semanas (BECK *et al.*, 1999).

A delimitação dos sintomas dentro de um espaço de tempo forma os critérios diagnósticos necessários para a classificação do transtorno depressivo em transtorno depressivo maior, transtorno depressivo menor, distímia ou depressão induzida por substância ou devida a uma condição clínica (DSM-IV, 1994). Ainda com relação aos sintomas depressivos, considera-se que

cada um deles está associado hipoteticamente à deficiência do processamento de informações em circuitos cerebrais específicos (**Figura 4**). O circuito do humor deprimido, por exemplo, envolve uma transmissão monoaminérgica deficiente à nível de amígdala e córtex pré-frontal ventromedial, enquanto que o circuito da baixa auto-estima envolve as mesmas áreas cerebrais, mas está associado principalmente a uma transmissão serotoninérgica deficiente (STAHL, 2010).

**Figura 4** - Correspondência entre sintomas depressivos e circuitos.



Fonte: STAHL et al, 2010. Nota: Siglas: CPF: córtex pré-frontal; PB: prosencefalo basal; E: estriado; NA: *nucleus accumbens*; T: tálamo; HP: hipotálamo; H: hipocampo; A: amígdala, ME: medula espinhal e C: cerebelo.

Nos últimos anos, muito esforço foi direcionado para melhorar o entendimento sobre a fisiopatologia da depressão. Até o momento, tem-se convicção da participação de fatores biológicos, psicológicos e sociais no desencadeamento da doença (ANSSEAU *et al.*, 2009).



Devido à heterogeneidade clínica e etiológica dos transtornos depressivos, tem sido difícil elucidar por completo a fisiopatologia da depressão. As teorias disponíveis são baseadas em estudos que investigam o estresse psicossocial e os hormônios do estresse, os neurotransmissores (serotonina, noradrenalina, dopamina, glutamato e ácido gama-aminobutírico - GABA), a resposta inflamatória, o estresse oxidativo, os neurocircuitos, os fatores neurotróficos e o ritmo circadiano (HASLER, 2010).

Considera-se que as teorias da depressão se aplicam aparentemente a apenas alguns tipos de pacientes deprimidos, e, além disso, tem-se observado que a fisiopatologia depressiva pode variar consideravelmente em todo o curso da doença. Diante dessas evidências, defende-se que não há uma hipótese unificada que explique todos os casos de depressão. Como consequência, os tratamentos antidepressivos, incluindo abordagens psicológicas e biológicas, devem ser adaptados de acordo com o indivíduo e o estado de doença (HASLER, 2010).

Dentre as teorias sobre a etiologia biológica da depressão, a teoria clássica propõe a hipótese de que a doença se deve à deficiência dos neurotransmissores monoamínicos: noradrenalina (NA), dopamina (DA) e serotonina (5-HT). Segundo esse pensamento, o sistema neurotransmissor trimonoaminérgico pode estar disfuncional em diversos circuitos cerebrais, com diferentes neurotransmissores envolvidos, dependendo do perfil de sintomas do paciente, podendo provavelmente ser secundária a um evento primário (STAHL, 2010; HASLER, 2010).

As evidências diretas da hipótese monoaminérgica ainda são insuficientes. Mas alguns estudos apresentam como resultado de investigação baixos níveis de metabólitos monoaminérgicos no liquor cefalorraquidiano de pacientes deprimidos. Estes achados estão em conformidade com a observação da efetividade clínica dos antidepressivos que agem aumentando a sinalização monoaminérgica (NUTT, 2006; LEONARD, 2000).

A teoria clássica foi levada a um passo adiante quando formularam a hipótese dos receptores monoaminérgicos. Esta hipótese sugere que a depleção dos neurotransmissores verificada nos pacientes deprimidos seria responsável por uma supra-regulação compensatória dos receptores pós-sinápticos. As evidências diretas disso ainda são escassas, mas estudos *post mortem* mostraram consistentemente o aumento no número de receptores de serotonina no córtex pré-frontal de pacientes que cometem suicídio e, além disso, estudos de neuroimagem

identificaram anormalidades nos receptores de serotonina em pacientes deprimidos (STAHL, 2010).

Todos os antidepressivos eficazes atuais reforçam a ação sináptica de uma ou mais monoaminas (NA, DA, 5-HT) e, dessa forma, revertem, teoricamente, a supra-regulação compensatória dos receptores ao longo do tempo. Esse fenômeno é mediado provavelmente pelo processo de sub-regulação de genes relacionados com a síntese dos receptores. Vale destacar ainda que as alterações na expressão gênica também podem incluir o aumento de fatores neurotróficos, como o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), importantes reguladores da sobrevivência, desenvolvimento, função e plasticidade neuronal (STAHL, 2010).

### 1.3.1 Receptores Monoaminérgicos

Os neurônios noradrenérgicos são regulados por uma multiplicidade de receptores classificados como  $\alpha_{1A/B/C}$ ,  $\alpha_{2A/B/C}$ ,  $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ,  $\beta_3$ . Todos eles podem ser pós-sinápticos, mas somente os receptores  $\alpha_2$  tem localização pré-sináptica e agem como autorreceptores, ou seja, reconhecem a NA e desativam sua liberação adicional (STAHL, 2010).

Os adrenoceptores  $\alpha_1$  e  $\alpha_2$  (**Quadro 1, pág. 34**) parecem estar envolvidos com a geração de respostas antidepressivas à drogas (KASTER *et al.*, 2007). A administração crônica de antidepressivos e a electroconvulsoterapia aumentam a densidade e atividade funcional de adrenoceptores  $\alpha_1$  em estruturas cerebrais de indivíduos deprimidos, tais como o córtex pré-frontal e hipocampo (STONE *et al.*, 2003). Além disso, o tratamento crônico com antidepressivos causa uma regulação gradual e para baixo no número de autoreceptores  $\alpha_2$ , o que parece ser de extrema importância terapêutica, tendo em vista que o número destes receptores estão elevados tanto nos pacientes deprimidos quanto naqueles estressados (FLÜGGE *et al.*, 2003).

**Quadro 1** - Vias de sinalização, localização e farmacologia de subtipos de receptor NA

Receptor	Via de sinalização principal	Localização Neuronal	Localização regional
$\alpha_1$	$\uparrow$ IP <sub>3</sub> e DAG	Pós-sináptico	Córtex frontal, <i>Locus coeruleus</i> , hipocampo.
$\alpha_2$	AMPC $\downarrow$	Pré-sináptico/ Pós-sináptico	Córtex frontal, <i>Locus coeruleus</i> , amígdala, hipocampo, hipotálamo.

**Fonte:** Adaptado de <http://www.acnp.org/g4/GN401000034/CH034.html>.

**Nota:** AMPC - adenosina 3',5'-monofosfato cíclico ; IP<sub>3</sub> – trifosfato de inositol; DAG - D-1,2-Diacilglicerol.

Drogas que antagonizem os receptores do tipo  $\alpha_2$  nos neurônios noradrenérgico e 5-HT serotoninérgico (por exemplo, mirtazapina, risperidona), aumentam a liberação de NA e 5-HT, respectivamente, intensificando essas transmissões (STAHL, 2010).

Com relação à via serotoninérgica, estudos em modelos animais de depressão oferecem pistas da participação de seus receptores no processo terapêutico. Efeitos antidepressivos semelhantes aos produzidos pela administração de Inibidores Seletivos da Recaptação de serotonina (ISRS) têm sido mediado por agonistas dos receptores 5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>1B</sub>, 5-HT<sub>2C</sub>, 5-HT<sub>4</sub> e 5-HT<sub>6</sub>, e antagonistas de 5-HT<sub>2A</sub>, 5-HT<sub>3</sub>, 5-HT<sub>6</sub>, e 5-HT<sub>7</sub> em roedores (CARR e LUCKI, 2011). Informações sobre os diferentes subtipos de receptores serotoninérgicos estão dispostas no **Quadro 2, pág. 35**.

**Quadro 2** - Vias de sinalização, localização e farmacologia de subtipos de receptor 5-HT

Receptor	Via de sinalização principal	Localização Neuronal	Localização regional
5-HT <sub>1A</sub>	AMPC↓	Autorreceptor somático/pós-sináptico	Núcleo da rafe / hipocampo, córtex
5-HT <sub>1B</sub>	AMPC↓	Autorreceptor terminal/pós-sináptico	Striatum, <i>nucleus accumbens</i> , área tegmental ventral
5-HT <sub>2A</sub>	IP <sub>3</sub>	Pós-sináptico	Córtex frontal
5-HT <sub>2C</sub>	IP <sub>3</sub>	Pós-sináptico	Córtex frontal
5-HT <sub>3</sub>	Canal iônico	Pós-sináptico	Córtex, amígdala
5-HT <sub>4</sub>	AMPC↑	Pós-sináptico	Striatum, <i>nucleus accumbens</i> , córtex
5-HT <sub>6</sub>	AMPC↑	Pós-sináptico	Hipocampo, córtex
5-HT <sub>7</sub>	AMPC↑	Pós-sináptico	Núcleo supraquiasmático, córtex

**Fonte:** CARR; LUCKI, 2011. **Nota:** AMPC - adenosina 3',5'-monofosfato cíclico ; IP<sub>3</sub> – trifosfato de inositol.

Partindo do conhecimento de que a NA regula os neurônios serotoninérgicos e, reciprocamente, a 5-HT também regula os neurônios noradrenérgicos, podemos entender as consequências terapêuticas de moduladores destas vias. A mirtazapina, por exemplo, é um antidepressivo muito efetivo cujas ações terapêuticas são mediadas por suas propriedades antagonistas de  $\alpha_2$  e de 5-HT<sub>2C</sub>. Ao causar desinibição da liberação de serotonina, pelo primeiro mecanismo (antagonismo de  $\alpha_2$ ), a droga estimula principalmente receptores 5-HT<sub>1A</sub>, haja vista a ação antagonista potente da mirtazapina sobre outros receptores serotoninérgicos (5-HT<sub>2A</sub>, 5-HT<sub>2C</sub> e 5-HT<sub>3</sub>). A estimulação de 5-HT<sub>1A</sub>, por sua vez, acarreta liberação de dopamina, e isso seria, teoricamente, útil para a depressão e a cognição. Pelo segundo mecanismo de ação (antagonismo de 5-HT<sub>2C</sub>), a droga causa a desinibição de noradrenalina e serotonina no córtex pré-frontal (STAHL, 2010).

Quanto a terapêutica com outras classes de drogas, tem-se demonstrado em estudos recentes que antipsicóticos atípicos podem atuar como adjuvantes no tratamento da depressão. A olanzapina (antagonista 5-HT<sub>2A</sub>) combinada com a fluoxetina melhoram significativamente sintomas depressivos em comparação a pacientes tratados apenas com olanzapina ou fluoxetina (TRIVEDI *et al.* 2009).

Os receptores dopaminérgicos (D<sub>1</sub>, D<sub>2</sub>, D<sub>3</sub>, D<sub>4</sub> e D<sub>5</sub>) estão distribuídos em duas classes diferentes, denominadas D<sub>1</sub>-símile e D<sub>2</sub>-símile, que foram originalmente distinguidas por sua capacidade de ativar (D<sub>1</sub>-símile) ou inibir (D<sub>2</sub>-símile) a adenilato ciclase (**Quadro 3**).

**Quadro 3** - Receptores dopaminérgicos.

Distribuição	Papel Funcional	Tipo D <sub>1</sub>		Tipo D <sub>2</sub>		
		D <sub>1</sub>	D <sub>5</sub>	D <sub>2</sub>	D <sub>3</sub>	D <sub>4</sub>
Córtex	Reatividade, Humor	+++	-	++	-	+
Sistema límbico	Emoção, Comportamento Estereotipado	+++	+	++	+	
Estriado	Controle motor	+++	+	++	+	+
Hipotálamo ventral e adeno- hipófise	Secreção de prolactina	-	-	++	+	-
<b>Transdução de sinais</b>		↑AMPc	↑AMPc	↓AMPc e/ou ↑IP <sub>3</sub>	↓AMPc e/ou ↑IP <sub>3</sub>	↓AMPc e/ou ↑IP <sub>3</sub>
<b>Efeito</b>		Inibição pós- sináptica	Inibição pós- sináptica	Inibição pré- e pós- sináptica  Ativação/ inibição da secreção de hormônios	Inibição pré- e pós- sináptica  Ativação/ inibição da secreção de hormônios	Inibição pré- e pós- sináptica  Ativação/ inibição da secreção de hormônios

Fonte: RANG *et al.*, 2012. **Nota:** AMPc - adenosina 3',5'-monofosfato cíclico ; IP<sub>3</sub> – trifosfato de inositol.

Os receptores D<sub>2</sub> desempenham um papel importante na regulação da transmissão DA (KATZUNG, 2013). Vários estudos clínicos têm demonstrado a eficácia terapêutica de antagonistas de D<sub>2</sub> (sulpirida e raclopride) nos diferentes tipos de depressão. De fato, tem-se sugerido que a administração de sulpirida em baixas doses (100-300 mg/dia) pode ser eficaz em pacientes com depressão leve, incluindo aqueles que sofrem de depressão endógena (NISKANEN *et al.*, 1975; BENKERT; HOLSBOER, 1984). O mecanismo de ação antidepressiva da amissulpirida parece envolver o bloqueio do sistema dopaminérgico, mais especificamente, o bloqueio de receptores pré-sinápticos dopaminérgicos do tipo D<sub>2</sub>/D<sub>3</sub> e uma possível sensibilização de receptores D<sub>1</sub> e D<sub>2</sub> na área mesolímbica (TSUKAMOTO *et al.*, 1994). Esta área tem provável participação no desenvolvimento do comportamento motivacional, haja visto que a hipofunção do sistema dopaminérgico mesolímbico pode mediar a anedonia e a apatia, dois sintomas depressivos (WILLNER, 1995).

Ainda com relação à amissulpirida, se administrada em doses mais altas, perde a especificidade para os receptores pré-sinápticos e passa a bloquear também os receptores D<sub>2</sub>/D<sub>3</sub> pós-sinápticos, causando assim depressão (WILLNER, 2002). Com relação à participação dos receptores D<sub>1</sub> nos transtornos afetivos, esta tem sido demonstrada pela administração do antagonista seletivo de D<sub>1</sub>, SCH23390 (YAMADA *et al.*, 2004).

### **1.3.2 Hipótese inflamatória e neurodegenerativa da depressão**

Na década de 80 foram publicados os primeiros trabalhos sobre o envolvimento de mecanismos neuroinflamatórios na depressão relacionados à ativação de células monocíticas e células T. Com isso, na prática clínica foram lançadas as bases para uma nova hipótese de que a inflamação e a ativação imunitária mediada por células são fatores chaves na depressão (MAES *et al.*, 1990-1991, 1991b, 1993, 1993a).

O papel das citocinas na depressão foi proposto pela primeira vez por Smith (SMITH, 2005), sob a forma da "teoria de macrófagos de depressão" e ainda estudada por Maes no início de 1990 (MAES; SONG; YIRMIYA, 2012). Esta teoria foi postulada na observação das

concentrações sanguíneas elevadas de marcadores inflamatórios, em pacientes com depressão clínica grave, associada a uma resposta de fase aguda. Segundo esta teoria, as citocinas pró-inflamatórias são responsáveis pela resposta da fase aguda na inflamação, ocasionando vários aspectos clínicos da depressão, como hiperatividade do eixo HPA e distúrbio no metabolismo da serotonina (MAES, 1993a). Com base em evidências de investigação e revisão literária de Smith 1991, concordou-se que os macrófagos são ativados pelos linfócitos T e, portanto, que a depressão é caracterizada pela ativação imune mediada por células (MAES; SMITH; SHARPE, 1995). Com isso, os sintomas psicossomáticos ou vegetativos que ocorrem na depressão são manifestações celulares, mediada pela ativação imunitária, e se assemelham com os comportamentos tipo-depressivos em modelos de animais (MAES, 1993; MAES *et al.*, 1993).

Com o passar dos anos, a teoria dos macrófagos mudou para “Teoria de ativação do Sistema de Resposta Inflamatório (IRS)”, devido a muitos aspectos do sistema inflamatório serem correlacionados com a imunidade celular durante a depressão maior (SONG *et al.*, 1998; VANWEST; MAES, 1999). Tradicionalmente, a inflamação envolve a síntese e liberação de mediadores pró- inflamatórios, tais como citocinas e quimiocinas. Nesse processo, são envolvidas células como, monócitos, neutrófilos e macrófagos, células da cascata do complemento (SCHIEPERS; WICHERS; MAES, 2005).

A ativação do IRS na depressão está relacionada com a hiperatividade dos índices de hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA), sugerindo que a depressão é induzida por citocinas pró-inflamatórias. A hiperatividade do eixo ocorre pela interação imunoendócrina, ou seja, as citocinas IL-1, IL-6 e TNF- $\alpha$  também aumentam a secreção de ACTH por ação direta ou mediante aumento do efeito do CRH, evidenciando essa hiperatividade (MAES *et al.*, 1993a, 1993d).

Recentemente, a hipótese de depressão tem como teoria "Resposta inflamatória e (neuro) degenerativa (I & ND) (MAES, 2010). Esta teoria reúne os conceitos inflamatórios por vias de estresse oxidativo e nitrosativo acompanhada por neurodegeneração e diminuição da neurogênese. A teoria implica que o neuroprogressão em depressão é causado por múltiplas vias de estresse oxidativo e nitrosativo (ZUNSZAIN; HEPGUL; PARIANTE, 2013; GARDNER e BOLES, 2010; MAES *et al.*, 2010).

A neuroinflamação tem sido utilizada para descrever o papel dos processos inflamatórios na fisiopatologia da maioria das doenças neurodegenerativas (RIDET, 1997; BAUER, 2007). As respostas inflamatórias no SNC já foram associadas a muitas doenças crônicas neurodegenerativas como doença de Alzheimer, doença de Parkinson, esclerose múltipla e esclerose lateral amiotrófica (MCGEER, 2004; BLOCK; HONG, 2005; PHILLIS, 2006; UBOGU, 2006; TANSEY, 2007, MELLO, 2012).

O cérebro contém células do sistema imunológico, tais como macrófagos e células dendríticas, as quais estão presentes no plexo coróide e meninges. Macrófagos cerebrais parenquimatosos, conhecidos como células microgliais, são mais quiescentes em comparação com os macrófagos de tecidos, mas podem responder a estímulos inflamatórios através da produção de citocinas pró-inflamatórias e prostaglandinas. Além disso, tanto células cerebrais neuronais e não neuronais expressam receptores para estes mediadores (DANTZER, 2006).

A micróglia têm estados diversos de ativação, que dependem do estímulo inflamatório específico. Assim, em situações de transiente estimulação inata imune periférica, marcadores no SNC, tais como receptores *Toll-like* (TLRs) podem indicar ativação da micróglia (MILLER, 2003). A micróglia está principalmente envolvida na vigilância imunológica (DAVALOS *et al.*, 2005; NIMMERJAHN; KIRCHHOFF; HELMCHEN , 2005), mas quando ativada, os macrófagos têm capacidades semelhantes, incluindo fagocitose de citocinas, produção inflamatória e apresentação de antígeno (GARDEN; MILLER, 2006). Micróglia e astroglia também são considerados como uma fonte de mediadores inflamatórios e como geradores de oxidantes reativos, o chamado "lado escuro" da glia, por causa do potencial para estas respostas ao danificar alvos neuronais (HUANG *et al.*, 2007).

As alterações neuroinflamatórias da micróglia são transitórias, retornando a um estado de repouso quando o estímulo imune estiver cessado. No entanto, o envelhecimento ou a doença neurológica, pode proporcionar um ambiente do cérebro mais reativo ou preparado para um desafio imune periférico. Além disso, estudos relataram que uma consequência biológica deste perfil glial reativo é devido à resposta neuroinflamatória exagerada ao desafio imune inato (GODBOUT *et al.*, 2005).



As citocinas pró-inflamatórias no SNC são parcialmente responsáveis pelos sintomas comportamentais tipo-depressivos, por exemplo, anorexia, isolamento social e anedonia (KELLEY *et al.*, 2003; GODBOUT *et al.*, 2005; HUANG *et al.*, 2007), as quais alteram a plasticidade sináptica em animais (MURRAY; LYNCH, 1998). A resposta inflamatória de citocinas excessivas no cérebro está associada a uma variedade de complicações, incluindo a disfunção cognitiva (GODBOUT *et al.*, 2005; CHEN *et al.*, 2008).

A evidência de dano oxidativo tem sido consistentemente mostrada nos episódios de humor (ANDREAZZA *et al.*, 2008). Estresse Oxidativo ocorre quando espécies reativas de oxigênio interagem com lipídios, proteínas ou ácidos nucleicos. O dano oxidativo é um mecanismo de lesão celular em certo número de condições, incluindo estados inflamatórios e neurodegeneração. O estresse oxidativo fornece uma ligação entre dano oxidativo e inflamação sistêmica (ZHANG *et al.*, 2009). Os neurônios e glia são particularmente vulneráveis a processos inflamatórios e estado redox, e são dependentes da manutenção do suporte neurotrófico. Algumas destas alterações, ocorrendo durante os episódios de humor podem conduzir à disfunção mitocondrial (BOULANGER *et al.*, 2009).

A ativação de macrófagos e micróglia no SNC, contribuem para a produção de mediadores oxidativos e neuroativos que podem influenciar o comportamento. Por exemplo, citocinas inflamatórias no SNC sobrerregulam a enzima IDO (indoleamina-2,3-dihidroxigenase), a qual metaboliza o triptofano em L-quinurenina. Assim, níveis reduzidos de triptofano irão influenciar a síntese da serotonina. A produção elevada de mediadores neuroativos, incluindo 3-hidroxiquinurenina e ácido quinolínico induzem danos neuronais por estresse oxidativo. Estudos mostraram um importante mecanismo de complicações do comportamento e humor com a inflamação, devido à degradação do triptofano, impactando nas vias serotoninérgicas e glutamatérgicas (DANTZER, 2008; ARAÚJO, 2015).

Estudos relatam que os sintomas depressivos apresentam uma correlação positiva com o aumento da concentração de ROS, radicais de espécies de oxigênio (ROS). As respostas inflamatórias e CMI são acompanhadas por um aumento produção de radicais de espécies de oxigênio e radicais de nitrogênio (MAES; SONG; YIRMIYA, 2012).

Existe um mecanismo que liga o estado oxidativo com sintomas depressivos. O eixo da hiperatividade do hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) é frequentemente observado em pacientes com depressão maior (GERACIOTI *et al.*, 2001). Os distúrbios no organismo evocam uma resposta ao estresse, que serve para restaurar a homeostase e para facilitar a adaptação a esta perturbação.

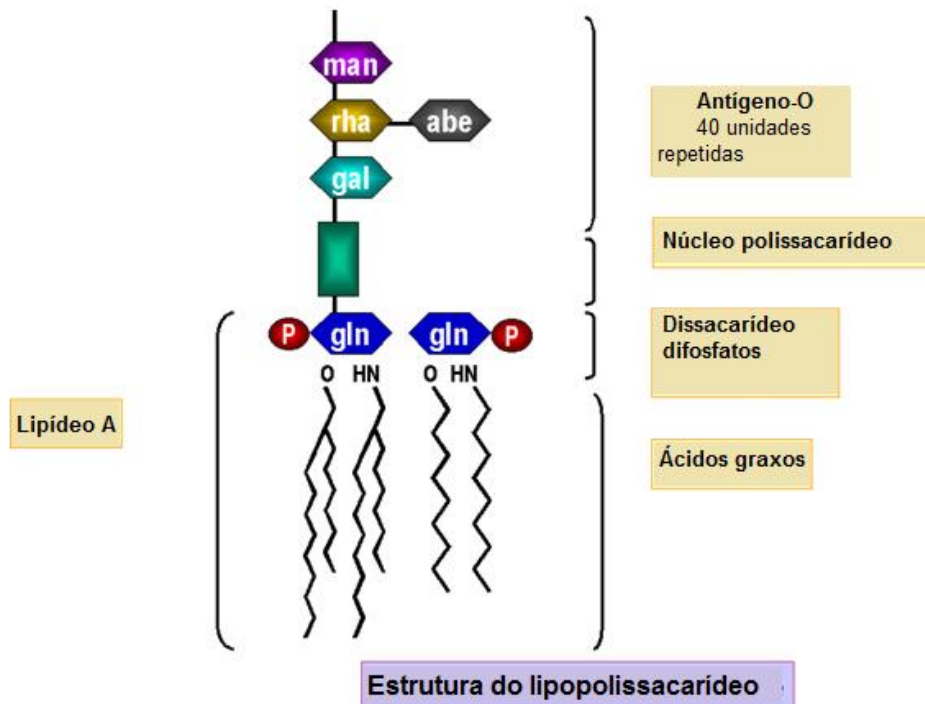
A principal força motriz do eixo HPA é hormônio liberador de corticotrofina (CRH), que atua em sinergia com arginina-vasopressina (AVP), levando à liberação de glicocorticoides, cortisol no homem e corticosterona em roedores. A corticosterona mantém a atividade basal do eixo HPA e controla a sensibilidade ou limiar de resposta do sistema ao estresse. Com isso, a corticosterona coordena outros eventos como o ciclo sono/vigília, a ingestão de alimentos, entre outros. A corticosterona também exerce um feedback inibitório principalmente na hipófise e neurônios de núcleo paraventricular, encerrando o estresse induzido pela ativação do eixo, conforme **figura 2, pág. 27** (DE KLOET *et al.*, 1998).

#### **1.4 Modelo animal de depressão por Lipopolissacarídeo (LPS):**

Lipopolissacarídeo (LPS) é uma endotoxina originária da parede celular de bactérias gram-negativas. Consiste num lipídio complexo, denominado lipídio A, ao qual está ligado um polissacarídeo constituído de um núcleo (ou core) e de uma série terminal de unidades repetidas (Figura 7). O lipídio A consiste em unidades dissacarídicas de glicosamina fosforilada as quais estão ligadas a vários ácidos graxos de cadeia longa (podendo variar de acordo com a espécie bacteriana). O núcleo do polissacarídeo é semelhante em todas as espécies gram-negativas que possuem LPS, todavia, cada espécie contém uma unidade de repetição particular. Em geral, as unidades de repetição consistem em trissacarídeos lineares ou em tetra ou pentassacarídeos ramificados (BROOKS; BUTEL; MORSE, 2000). As moléculas de LPS de carga negativa são ligadas de forma não covalente por cátions divalentes, tornando a membrana estabilizada e proporcionando uma barreira contra moléculas hidrofóbicas. As substâncias são termoestáveis, com peso molecular entre 3000 e vários milhões (BROOKS; BUTEL; MORSE, 2000).

Patógenos bacterianos entéricos contendo antígenos O, como um componente do LPS, podem promover resistência e fagocitose, aumentando a patogenicidade dos membros da família *Enterobacteriaceae*, a qual pertence à espécie *Escherichia coli* (HART, 1988; SWIERGIEL *et al.*, 1999).

**Figura 5:** Esquema da composição do LPS na parede celular de bactérias gram-negativas



Fonte: Adaptado de [http://www.microbiologybook.org/Portuguese/chapter\\_4\\_bp.htm](http://www.microbiologybook.org/Portuguese/chapter_4_bp.htm)

O LPS é sintetizado na membrana citoplasmática e transportado para sua posição exterior final. É ligado à superfície celular, liberado apenas quando as células são lisadas. Quando o LPS é clivado em lipídio A e em polissacarídeo, toda a interação imune está associada ao lipídio A. A especificidade antigênica é conferida pelas unidades terminais de repetição, que circundam a célula, formando uma camada de polissacarídeos hidrofílicos (BROOKS; BUTEL; MORSE, 2000). A presença do LPS é necessária para a função de muitas proteínas da membrana externa das bactérias (BROOKS; BUTEL; MORSE, 2000). Porém, o LPS pode ser extremamente tóxico para animais. Administrações em doses menores que 1 nM já são capazes de ativar o sistema imune do animal (ADEREM, 2000). Os efeitos fisiopatológicos do LPS são semelhantes, independente de sua origem bacteriana (BROOKS; BUTEL; MORSE, 2000). Dentro da área médica e veterinária, o LPS é muito utilizado nas mais diferentes linhas de pesquisa, pelo seu efeito de estímulo do sistema imunológico. É muito empregado em animais de laboratório, como roedores, por exemplo. Comercialmente, para estudos toxicológicos, neuroimunológicos, dentre

outros, uma das principais fontes de LPS é a partir da bactéria gram-negativa *Escherichia coli*, através de um processo de extração fenólica (MIMS *et al*, 1999).

#### 1.4.1 Mecanismo de ação do LPS

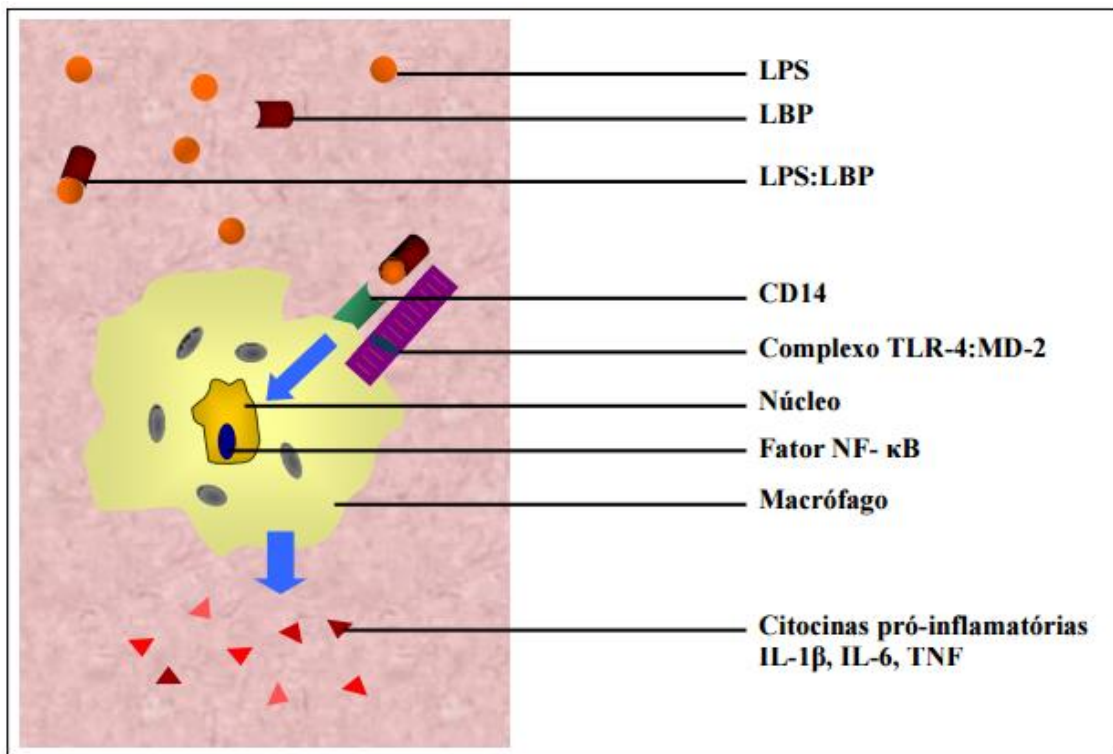
Uma vez que o LPS entra em contato com o organismo animal, seja a partir de uma bactéria gram-negativa como a *Escherichia coli*, ou pela administração direta do mesmo, inicia-se uma série de respostas no organismo infectado. Esta endotoxina pode atuar em macrófagos, monócitos, neutrófilos, plaquetas sanguíneas e células endoteliais (SALUK-JUSZCZAK; WACHOWICZ, 2005).

Tomando como exemplo o mecanismo de ação por meio do macrófago, inicialmente, o LPS que se encontra no plasma liga-se a uma proteína de fase aguda do hospedeiro, o LBP (proteína ligadora de LPS, ou lipopolysaccharide binding protein), produzida no fígado do animal. A partir deste passo, é formado um complexo chamado de LPS:LBP. O complexo transfere o LPS para a proteína de membrana periférica CD14 na superfície dos macrófagos, iniciando a ativação celular (FENTON, 1998; ADEREM, 2000; MIYAKE, 2003; MURPHY, 2010). A **figura 6** ilustra o mecanismo de ação simplificado do LPS no macrófago.

O novo complexo formado, chamado de LPS:CD14, ativa a sinalização do receptor semelhante ao Toll (ou *toll-like* receptor, TLR)-4, ao qual é complexada à proteína MD-2. Neste momento é iniciada a geração do sinal transmembranar para o núcleo. Dentro do macrófago ocorre uma série de reações em cascata, incluindo a atuação de MyD88, IRAK, TRAF6, TAK-1, quinase I $\kappa$ B, AP-1, dentre outras (algumas ainda não elucidadas), até a ativação do fator de transcrição NF- $\kappa$ B, que ativa os genes que codificam as proteínas envolvidas na defesa contra a infecção, que são as citocinas pró-inflamatórias (ADEREM, 2000; HARJU *et al.*, 2005; ROMERO R. *et al.*, 2007; MURPHY, 2010). Entre as citocinas pró-inflamatórias ativadas e liberadas a partir do contato com o LPS, destacam-se a interleucina 1 beta (IL-1 $\beta$ ), a interleucina 6 (IL-6) e o TNF- $\alpha$ , além de algumas outras (HAVA *et al.*, 2006). O LPS é capaz de ativar principalmente a resposta imune inata (inespecífica) com a participação dos macrófagos. Atua também na resposta imune adquirida (ou adaptativa), referente a respostas de linfócitos que

reconhecem antígenos microbianos específicos (com atuação dos TLR-4, na ativação de membros da família B7, que ativam células T naive) (ADEREM, 2000; LEVITON, 2005).

**Figura 6** - Mecanismo de ação simplificado do LPS em um macrófago, culminando com a liberação de citocinas pró-inflamatórias.



Fonte: KIRSTEN, 2012.

Em condições normais, o LPS e as citocinas não são capazes de atravessar a barreira hematoencefálica em quantidades significantes (ASHDOWN et al., 2006; DUNN, 2006). Apesar disso, as citocinas liberadas por meio do LPS podem atuar no SNC do animal, onde interferem com sua homeostasia. As vias pelas quais as citocinas modulam a ação do SNC são:

- Através do nervo vago (que é a principal via aferente da cavidade abdominal para o cérebro): as citocinas liberadas podem entrar em contato com terminações de ramificações vagais periféricas, as quais possuem receptores para citocinas. A ativação desses receptores inicia a transmissão de um impulso nervoso pelo nervo vago aferente até sua ligação no encéfalo (no núcleo vagal). A importância dessa via é demonstrada por meio da vagotomia em roedores, e posterior injeção i.p. de

IL-1, resultando na ausência do comportamento doentio nestes animais (DANTZER *et al.*, 2006).

- O LPS é ainda capaz de induzir a síntese da enzima óxido nítrico sintase, que leva a produção do óxido nítrico, que é um importante mediador inflamatório, com ação vasodilatadora, podendo agir também no SNC (ROCHE *et al.*, 2006; MURATORE *et al.*, 2009).

Neste sentido, a micróglia é considerada um análogo dos macrófagos e “órgão imune” do cérebro, com função de combater infecções e a inflamação (LENT, 2001; MEYER *et al.*, 2005; HAVA *et al.*, 2006; XU *et al.*, 2006).

O modelo de depressão induzido por LPS tem importante validade translacional visto que a liberação de cortisol leva a um aumento de permeabilidade intestinal e mudança do perfil da flora para gram-negativo. Neste contexto, no estresse crônico, o LPS presente no intestino pode atingir a corrente sanguínea sendo o responsável pelo desencadeamento e manutenção das alterações neuroinflamatórias em pacientes deprimidos.

## 1.5 O poder terapêutico dos produtos naturais

O conhecimento e uso de plantas medicinais acompanham a humanidade desde o início da civilização. Com o passar dos séculos, foi sendo acumulada uma grande gama de informações sobre as ações e os princípios ativos de várias espécies vegetais. Atualmente são utilizadas pela medicina popular mais de 20.000 espécies distintas de plantas medicinais, simbolizando muitas vezes o único recurso terapêutico de várias comunidades e populações. Antes dos anos 1800, os princípios ativos de grande parte dos medicamentos, em geral à base de plantas, eram desconhecidos. Até que em 1817, Friedrich Sertürner isolou o primeiro composto puro e farmacologicamente ativo, a morfina, a partir de uma planta, a *Papaver somniferum* e, com o sucesso terapêutico do novo fármaco, aumentou o interesse da comunidade científica sobre o poder terapêutico das plantas (NEWMAN; CRAGG, 2010).

A pesquisa farmacêutica expandiu-se ainda mais após a Segunda Guerra Mundial, com um maior número de pesquisas com microorganismos por causa da descoberta da penicilina. A investigação dos produtos naturais como fonte de novos fármacos atingiu o seu auge na indústria farmacêutica ocidental durante o período de 1970-1980. Em 1990, cerca de 80% dos medicamentos eram produtos naturais ou análogos inspirado neles, mas esse percentual caiu ao longo dos anos, e em 2009 cerca de 40% dos agentes terapêuticos eram derivados de fontes biológicas (LI; VEDERAS, 2009).

A medicina tradicional ainda é o suporte principal de cerca da 75-80% da população mundial, principalmente, em países subdesenvolvidos. A Índia, que mantém uma antiga tradição em medicina popular tem produzido remédios simples e eficientes usando plantas e seus compostos derivados. Desta forma, necessita-se de validação por meio de pesquisas científicas que utilizem modelos adequados de experimentação, para comprovação dos efeitos farmacológicos através do isolamento, purificação e caracterização de princípios ativos, para que se possa obter a formulação de fitoterápicos seguros para uso humano e/ou animal. Sendo assim, o estudo da dose, concentração e via de administração são essenciais (ZHAN; ZHOU, 2003).

A pesquisa sistemática para a obtenção de novas substâncias com finalidade terapêutica pode ser executada por meio de vários processos. Os mais utilizados são a síntese de novas moléculas, e modificação molecular e substâncias naturais e/ou sintéticas com propriedades farmacológicas definidas, extração, isolamento e purificação de novos compostos de fontes naturais, especialmente os de origem potencialmente ativas como medicamento. Os trabalhos de pesquisa com plantas medicinais, via de regra, originaram medicamentos em menor tempo, com custos muitas vezes inferiores e conseqüentemente, mais acessíveis à população (BRITO, 1993).

A análise dos produtos naturais revela uma considerável diversidade em termos de estrutura e propriedades físico-químicas e biológicas. Esta diversidade permite as “moléculas da natureza” atingir um número quase ilimitado de macromoléculas biológicas, muitas vezes de forma altamente seletiva. Com relação a isso, tem-se acreditado que em comparação aos sintéticos, os compostos naturais tendem a ser muito superiores em termos de diversidade, eficiência e especificidade de ligação e propensão para interagir com alvos biológicos (CARLSON, 2010).



A constatação da presença dos efeitos adversos para os fármacos já estabelecidos no mercado denota a importância da busca por novas moléculas efetivas para o tratamento da ansiedade. Porém, a maior limitação nos esforços para desenvolver novos fármacos reside no fato de que os mesmos são geralmente sintetizados através da estratégia de modificação molecular *me too*, ou seja, apenas são modificados alguns locais da molécula original, não sendo obtido um fármaco realmente inovador (NUTT; ARGYROPOULOS, 1999).

As plantas medicinais vêm como uma fonte praticamente inesgotável de moléculas inovadoras e com novos alvos farmacológicos, que podem apresentar melhor relação de risco/benefício do que os medicamentos tradicionais. A diversidade estrutural encontrada na natureza é importante na busca por novos alvos biológicos e protótipos de fármacos (YUNES; FILHO, 2001). Uma das principais ferramentas na busca destes novos modelos é a informação de como as plantas são utilizadas por diferentes grupos étnicos e o estudo químico e farmacológico das preparações utilizadas, respectivamente no âmbito da etnobotânica e da etnofarmacologia (RATES, 2001).

Algumas espécies vegetais já têm seu uso aprovado para o tratamento de distúrbios de ansiedade. A Organização Mundial da Saúde considera que a espécie *Valeriana officinallis* pode ser utilizada *in natura* ou na produção de fitoterápicos, como alternativa aos benzodiazepínicos (OMS, 1999). Suas principais indicações de uso são como sedativo leve, no alívio dos estados de excitação nervosa, tensão, irritabilidade e ansiedade indutora de distúrbios de sono (ESCOPE, 1997; OMS, 1999; BLUMENTHAL; GOLDBERG; BRINCKMANN, 2000). Dentre as substâncias isoladas e comprovadamente ativas, valepotriatos, baldrinais e componentes do óleo essencial como o ácido valerênico, bem como flavonoides (FERNÁNDEZ *et al*, 2004).

Outra planta com uso terapêutico como ansiolítico e sedativo respaldado por ensaios clínicos é *Piper methysticum*, conhecida popularmente como cava-cava (PITTLER; EDZARD, 2003). Essas atividades são atribuídas a uma mistura de cavalactonas presentes no extrato, principalmente cavaína e iangonina (AMARAL; SCHENKEL; LANGELOH, 2002). No entanto, dados relativos à hepatotoxicidade têm limitado o uso de medicamentos à base de cava (CLOUATRE, 2004). Outras plantas como lúpulo (*Humulus lupulus*), melissa (*Melissa officinalis*) podem ser usadas como ansiolítico e sedativo (BLUMENTHAL, *et al*, 2000).

O Brasil apresenta uma flora bastante rica e diversificada, constituindo uma fonte potencial de novas substâncias com inúmeras ações farmacológicas. A magnitude da biodiversidade brasileira não é conhecida com precisão tal como a sua complexidade, estimando-se a existência de mais de dois milhões de espécies distintas de plantas, animais e microrganismos (DIAS, 1996). Juntos, os países da América Latina possuem grande parte da biodiversidade do mundo. Todavia, é estimado que não mais que 25.000 espécies de plantas foram objetos de alguma pequena investigação científica. (CALIXTO, 2003). Contudo, o potencial dos produtos de origem natural, como fontes de novas drogas, continua largamente inexplorado uma vez que somente pequena fração de plantas, animais e microrganismos tem sido investigada fitoquímica e biologicamente (HAMBURGER; HOSTETTMANN, 1991).

### 1.5.1 Considerações botânicas

*Egletes viscosa* Less, da família Asteraceae, é uma erva silvestre, anual, e frequente nas margens de lagoas, açudes, cursos de água do sertão e do litoral nordestino do Brasil, no início da estação seca, após o baixar das águas. Apresenta folhas recortadas e flores alvas com o centro amarelo, dispostas em pequenos capítulos, distribuídas na América intertropical (BRAGA, 1976). Pio Correia (1974) descreve-a como planta de folha pinatifida, 2 a 5 cm de comprimento, dilatada, capítulos florais curtos, no ápice dos ramos (**Figura 7, pág. 51**). É também conhecida por Losna-do-mato (Minas Gerais), Macela-do-Campo, Macela do Sertão, Marcela, Chá de Lagoa (Paraíba), Botancilla (Peru). Os capítulos florais, também conhecidos por cabecinhas, aparecem 1 a 3 meses após a estação chuvosa (MATOS, 1990). O verde intenso de sua folhagem contrasta com a cor parda da lama ressequida conferindo por algum tempo uma beleza verdejante à paisagem da terra rachada tão característica da região nordestina nos períodos secos (MATOS, 2000). No Ceará, a macela é bastante dispersa, sendo encontrada com facilidade em qualquer região do Estado. Foram coletados espécimes do Sul (Crato) ao Norte (Irauçuba), do litoral (Bela Cruz e São Gonçalo do Amarante) ao interior (Água verde e Chorozinho) (SILVEIRA; PESSOA, 2005).

Existem três espécies de Asteraceae de grande emprego na medicina popular, como protetoras estomacais, recebendo o nome de macela. *Chrysanthemum partenium* Less, *Achirocline saturoide* e *Egletes viscosa* Less, que são respectivamente, macela do reino, macela do Brasil e macela da terra (**Figura 7, pág. 51**)

Os capítulos florais de *E. viscosa*, secos são comercializados em larga escala na região do antigo mercado central de Fortaleza, na Praça da Sé, e em escala menor nos diversos ervanários populares e “raizeiros” distribuídos por todas as feiras livres das grandes e pequenas cidades do estado. Duas marcas fantasias, macela ANY e macela ISHASHI são encontradas em supermercados de Fortaleza (SILVEIRA; PESSOA, 2005), são obtidos de forma extrativista e comercializados para uso no tratamento caseiro de problemas digestivos e intestinais, cólicas, gases, azia, má digestão, diarreia e enxaqueca, bem como nos casos de irregularidades menstruais (LORENZI; MATOS, 2002).

Para cultivá-las, as sementes devem ser deixadas, inicialmente por um período de quatro a seis semanas, imersas em água, para quebra da dormência, e então semeadas. Os capítulos ou cabecinhas, facilmente encontrados no mercado de ervas, podem ser usados na forma de chá ou tintura. O chá de emprego mais habitual é preparado na ocasião do uso (MATOS, 2000). Em várias partes do Brasil, o chá elaborado por infusão é preparado dos capítulos florais de *E. viscosa* Less, sendo mais empregado no tratamento de problemas digestivos e intestinais (SILVEIRA; PESSOA, 2005)

Os estudos iniciais com macela comercial, principalmente no fim da década de 80, permitiram a obtenção de um óleo essencial caracterizado principalmente pela presença majoritária do acetato de trans-pinocarveíla. Como principais constituintes não voláteis, foram isolados dois diterpênicos furânicos: o ácido centipédico, majoritário, e o outro bicíclico, de esqueleto ent-clerodano, a lactona do ácido hawtrivaico. (SILVEIRA; PESSOA, 2005).

**Figura 7** - Fotografia de *Egletes viscosa* Less, mostrando folhas e capítulos florais.



Fonte: [http://www.cnip.org.br/banco\\_img/Macela/egletesviscosaless.html](http://www.cnip.org.br/banco_img/Macela/egletesviscosaless.html)

**Figura 8** - Capítulos florais de *E.viscosa* Less.



Fonte: <http://plants.jstor.org/compilation/egletes.viscosa>

### 1.5.2 Terpenos

Os terpenos representam uma classe de produtos naturais amplamente distribuída no reino vegetal, (NABETA et al., 1995). Esses compostos são encontrados especialmente como constituintes majoritários dos chamados óleos essenciais (GIRAL, 1956) e apresentam funções variadas (VICKERY; VICKERY, 1981).

Os compostos terpênicos possuem em comum o fato de serem constituídos por múltiplos ou inteiros da molécula fundamental do isopreno (2-metilbutadieno), que se origina a partir do ácido mevalônico. No entanto, distinção se faz entre os verdadeiros terpenos, ou seja, a denominação *stricto sensu* de terpeno se reserva para os hidrocarbonetos insaturados (terminação eno), estes podendo ser considerados como polímeros por adição ou condensação de moléculas do isopreno. Isto implica, além de uma fórmula bruta inteira do isopreno ( $C_5H_8$ ), como também uma estrutura ramificada que permita reconhecer as unidades integrantes da molécula (GIRAL, 1956).

Além destes verdadeiros terpenos (autênticos), temos os chamados terpenóides. A química dos terpenóides inclui compostos como alguns hidrocarbonetos que possuem menor ou maior teor de hidrogênio do que os terpenos verdadeiros, conservando no entanto a estrutura das unidades isoprênicas. Outros terpenóides são compostos formados por outras funções químicas como os álcoois, aldeídos, cetonas e ácidos terpênicos. Estes são derivados dos terpenos pela introdução do oxigênio na molécula terpenica. Todas estas substâncias podem ser agrupadas numa denominação mais genérica e vaga de compostos terpenóides. Os esqueletos carbonados dos terpenóides são formados pela condensação de um número variável de unidades de isopreno predominando a condensação cabeça-cauda, como mostra a (**Tabela 1**) (SIMÕES, 2007):

**Tabela 1 - Classificação dos terpenóides**

<b>UNIDADES DE ISOPRENO</b>	<b>NÚMERO DE CARBONOS</b>	<b>CLASSIFICAÇÃO</b>
<b>1</b>	<b>5</b>	<b>Hemiterpeno</b>
<b>2</b>	<b>10</b>	<b>Monoterpeno</b>
<b>3</b>	<b>15</b>	<b>Sesquiterpeno</b>
<b>4</b>	<b>20</b>	<b>Diterpeno</b>
<b>5</b>	<b>25</b>	<b>Sesterterpeno</b>
<b>6</b>	<b>30</b>	<b>Triterpeno</b>
<b>8</b>	<b>40</b>	<b>Tetraterpeno</b>
<b>&gt;8</b>	<b>&gt;40</b>	<b>Politerpeno</b>

Fonte: Santos (2005)

Esses compostos terpenóides apresentam variadas funções: os monoterpenos são constituintes dos óleos voláteis, atuando na atração de polinizadores. Os sesquiterpenos, em geral, apresentam funções protetoras contra fungos e bactérias, enquanto muitos diterpenóides são origem aos hormônios de crescimento vegetal. Os triterpenóides e seus derivados, os esteroides, apresentam uma gama de funções. Muitos têm funções de proteção contra herbívoros, alguns são antimutóticos, e outros atuam na germinação das sementes e na inibição do crescimento da raiz (VICKERY; VICKERY, 1981).

Os terpenóides podem ser encontrados nas formas cíclica e linear. As formas cíclicas poderão compor um número imenso de formas de estereoisômeros, por outro lado, os terpenóides lineares apresentam isomerismo geométrico nas duplas ligações isoprênicas. Os compostos mais frequentes nos óleos essenciais são os monoterpenos e os sesquiterpenos. Outros terpenóides, como diterpenos, são encontrados apenas em óleos essenciais extraídos com solventes orgânicos. O número de compostos terpênicos conhecidos ultrapassa a 8000, como componentes descritos em óleos essenciais é estimado um número superior a 150 monoterpenos e 1000 sesquiterpenos (SIMÕES, 2007).

Os compostos terpênicos apresentam importantes atividades farmacológicas, tais como, anti-tumoral (CARNESECCHI *et al*, 2004), sedativas (DO VALE *et al*, 2002), analgésicas, anti-inflamatórias (CARVALHO *et al*, 2004), ativadoras de proteína quinase A (RAJIC *et al*, 2001), cardioprotetoras (LIEBGOTT *et al*, 2000); bloqueadoras dos canais de cálcio (WANG *et al*, 2000) antioxidantes (ZHANG *et al*, 1996), hipolipidêmica (SILVA *et al*, 2001), anti-hipertensivas, relaxantes da musculatura lisa vascular (TORRES *et al*, 2000), antimicrobiana (MADUREIRA *et al*, 2003), antiulcerogênica (HIRUMA-LIMA, *et al*, 2002), gastroprotetoras (GUEDES, 2002), antinociceptiva (GUEDES, 2002; MAIA, 2006), antipruriticogênica e hepatoprotetora (OLIVEIRA *et al*, 2012).

Os diterpenos, por sua vez, são umas das poucas classes fundamentais de produtos naturais com uma variedade de aproximadamente 5000 membros conhecidos. Esses compostos orgânicos de baixo peso molecular apresentam um esqueleto contendo 20 átomos de carbono. Eles apresentam importância química e comercial porque o seu uso abrange aplicações na indústria farmacêutica (DZEROSKI *et al*, 1998). Os diterpenos constituem uma grande e diversificada classe de metabólitos secundários que podem ser considerados como resultados de fatores naturais e derivam biogeneticamente do pirofosfato de geraniol-geranila, que resulta do encadeamento cabeça-cauda de quatro unidades de isopreno (TORSSELL, 1983).

Muitos estudos realizados com extratos de plantas contendo diterpenos mostraram uma variedade de atividades farmacológicas, como atividade anti-ulcerogênica do *trans*-Crotonina, diterpeno isolado do *Croton cajucara* Benth (HIRUMA-LIMA *et al*, 2002); atividade analgésica e gastroprotetora, do ácido centipédico e da lactona do ácido hawtriwaico, diterpenos isolados dos capítulos florais de *E. viscosa* (GUEDES, 2002); atividade analgésica do mirsinol, diterpeno

isolado do *Euphorbia decipiens* (AHAMAD *et al*, 2005); atividade analgésica e anti-inflamatória do taxóide e lignanas, diterpenos isolados do *Taxus baccata* L. (KUPELI, *et al*, 2003).

O CZA é um diterpeno do tipo clerodano. Os clerodanos são uma classe de diterpenóides bicíclicos cujo nome deriva da (-)-clarodina, primeiro diterpeno da série dos clerodanos isolado da *Clerodendron infotunatum* (BARTON; ELAD, 1956). Variadas atividades biológicas são citadas para diferentes formas estruturais de clerodanos: antibiótica, antiviral, antifúngica, antitumoral, citotóxica, antiulcerogênica e inseticida (ROGERS *et al*, 1979; ANDERSEN *et al*, 1983).

### 1.5.3 Diterpeno conizaleucolídeo A

O diterpeno clerodano Colizaleucolídeo A (CZA), de massa molar 314.19 g/mol e fórmula molecular  $C_{20}H_{26}O_3$ , inicialmente encontrado na espécie *Leanneia schiedeana*. Essa espécie é utilizada na medicina popular ao redor do mundo no tratamento de inúmeras doenças, como distúrbios gastrintestinais, bronquite crônica, gota e reumatismo, adicionalmente sendo atribuídas atividades antipirética, anti-inflamatória, além de ser empregada como agente sedativo. O Conizaleucolídeo A também apresenta atividade em linhagem de células cancerígenas humanas de leucemia mielóide crônica (linhagem K-562, taxa de inibição de 84%) (ARCINIEGAS *et al*, 2011). O diterpeno Colizaleucolídeo A foi um dos constituintes majoritários encontrados no extrato etanólico de *E. viscosa*, sendo escolhido para o estudo juntamente com o próprio extrato etanólico.



***RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA***

---

---

## 2 RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA

*Egletes viscosa* é um produto natural cujo interesse químico e farmacológico é conhecido, existindo diversas aplicações para essa espécie, como o uso no tratamento caseiro de problemas digestivos e intestinais, cólicas, gases, azia, má digestão, diarreia e enxaqueca, bem como nos casos de irregularidades menstruais. O conhecimento de que a população local também utilizava as inflorescências da planta para uso em distúrbios de ansiedade, nos motivou a realizar testes neurocomportamentais iniciais com essa parte do vegetal. O interesse também advém do fato de que a referida espécie apresenta em sua composição diversas classes de compostos com atividade farmacológica, como diterpenos furânicos, diterpenos labdânicos, flavonoides, dentre outros. O grupo de neurofarmacologia da Universidade Federal do Ceará desenvolveu diversos trabalhos com substâncias naturais obtendo resultados promissores, o que motivou o desenvolvimento desse estudo (RAO, 2001; ARAÚJO, 2011; SOUSA, 2012; VASCONCELOS, 2015).

A relevância do presente estudo é contribuir com as buscas por melhores alternativas terapêuticas para os tratamentos da ansiedade e depressão, transtornos que juntos são responsáveis pelo maior número de prescrições na atualidade, (KATZUNG, 2013), sendo somente a Depressão Maior (DM), uma doença com prevalência estimada em mais de 16% da população mundial ao longo da vida (KESSLER *et al*, 2003; ANDRADE *et al*, 2002). Utilizando-se fontes naturais, buscou-se o desenvolvimento de fármacos de baixa toxicidade e mais acessíveis para a população carente, bem como a abrangência do tratamento para pacientes que pouco se beneficiam com as medidas terapêuticas atuais, sendo pelas limitações financeiras ou de eficácia dos próprios medicamentos.

***OBJETIVOS***

---

---

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral

Avaliar as ações centrais do extrato etanólico de *Egletes viscosa* e seu constituinte majoritário, o conizaleucolídeo A, através de modelos comportamentais de ansiedade e depressão, bem como determinar os possíveis efeitos preventivos e terapêuticos em animais adultos submetidos ao modelo de depressão por desafio imune induzido por LPS.

#### 3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar possíveis alterações na atividade motora e possível efeito relaxante muscular utilizando os testes do campo aberto e do *rota rod*, respectivamente;
- Verificar a atividade do extrato etanólico de *Egletes viscosa*, e seu constituinte majoritário, o conizaleucolídeo A, em modelos de ansiedade utilizando o teste labirinto em cruz elevado e a possível participação dos receptores GABA<sub>A</sub>/Benzodiazepínicos nesta ação;
- Determinar a ação do extrato etanólico de *Egletes viscosa*, e seu constituinte majoritário, o conizaleucolídeo A, em modelos comportamentais de depressão utilizando os testes da suspensão de sacarose e do nado forçado;
- Investigar a possível participação do sistema monoaminérgico no mecanismo de ação antidepressivo do extrato etanólico de *Egletes viscosa*, e seu constituinte majoritário, o conizaleucolídeo A;

- Avaliar as alterações comportamentais em animais submetidos ao modelo de comportamento depressivo induzido por LPS e tratados com extrato etanólico de *Egletes viscosa* (nas doses de 100 e 200 mg/kg) e seu constituinte majoritário, o conizaleucolídeo A (nas doses de 25 mg e 50 mg/kg) utilizando o teste do nado forçado e da preferência de sacarose;
- Avaliar a participação dos mecanismos de oxidação através dos níveis de GSH e TBARS, nas áreas cerebrais (córtex pré-frontal, corpo estriado e hipocampo) em animais com comportamento depressivo induzido por LPS e tratados com *Egletes viscosa* (nas doses de 100 e 200 mg/kg) e seu constituinte majoritário, o conizaleucolídeo A (nas doses de 25 mg e 50 mg/kg) .
- Avaliar a participação da resposta inflamatória e antioxidante através dos níveis de nitrito (NO) e Mieloperoxidase (MPO), nas áreas cerebrais (córtex pré-frontal, corpo estriado e hipocampo) em animais com comportamento depressivo induzido por LPS e tratados com *Egletes viscosa* (nas doses de 100 e 200 mg/kg) e seu constituinte majoritário, o conizaleucolídeo A (nas doses de 25 mg e 50 mg/kg) .

***MATERIAIS E MÉTODOS***

---

---

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

**Quadro 4 - Drogas e Reagentes**

<b>Drogas/Reagentes</b>	<b>Origem</b>
Álcool etílico P.A.	Quimex, Brasil
Diazepam	União Química Brasil
Flumazenil	Sigma
Imipramina	Imipra®, Cristália
SCH 23390	Sigma
Sulpirida	Equilid®, Aventis Pharma
Ioimbina	Sigma
Prazosina	Sigma
PCPA	Sigma
Tween 80 – Polyoxyethylene Sorbitan Mono-oleate	Sigma

### Quadro 5 – Equipamentos

Equipamentos	Origem
Balança Analítica	Modelo H5, Mettler, Suíça
Balança para animais	Filizola, Brasil
Campo Aberto	
Cronômetro	Incoterm, Brasil
Deionizador	USF, Elga, USA
Equipamento da Placa Perfurada	Ugo Basile, Italy
Equipamento do <i>Rota Rod</i>	Ugo Basile, Italy
Labirinto em cruz elevado	
Pipetas Automáticas	H.E., Dinamarca
Cubas de acrílico para o Nado Forçado	
Sonicador	Modelo PT 10-35. Brinkmann Instruments Inc., USA
Vidrarias	Pirex, Brasil



#### 4.1 Extração e isolamento do diterpeno conizaleucolídeo A

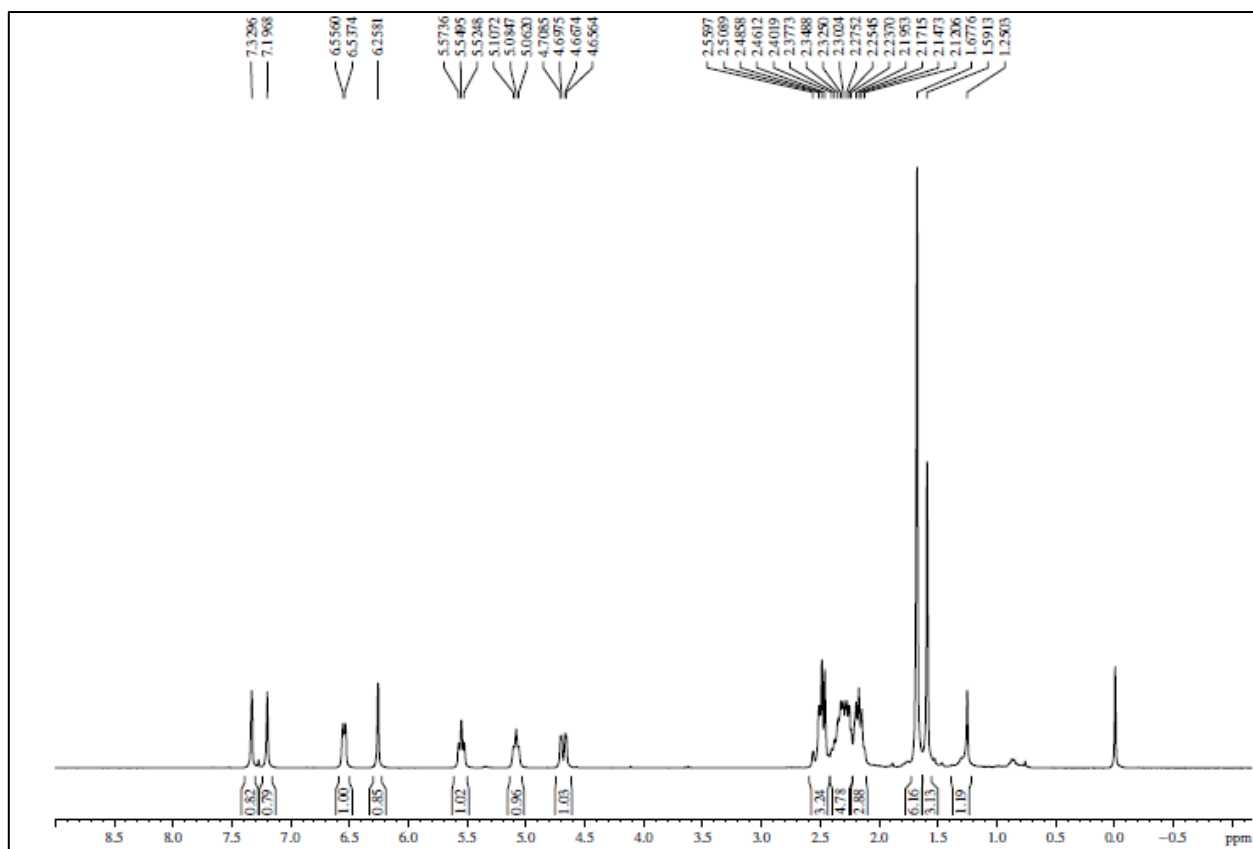
Para a realização deste trabalho foi utilizada uma espécie vegetal da família Asteraceae, onde se avaliaram os capítulos florais. Os capítulos florais de *E.viscosa* foram obtidos no centro de Fortaleza, onde partes da planta são comercializadas em lojas de produtos naturais. A autenticação botânica foi realizada pelo professor Edson Paula Nunes, professor titular do departamento de biologia da Universidade Federal do Ceará. A exsiccata representando a coleta encontra-se depositada no Herbário Prisco Bezerra – UFC, com o número 39767.

Os capítulos florais (1kg) foram macerados com 2 litros de hexano e em seguida, com 2 litros de etanol. As soluções foram então filtradas e posteriormente rotaevaporadas. O resíduo foi submetido a temperatura branda (60° C) por uma semana, sendo obtido 30,5 g (rendimento de 3,05% p/p) de extrato hexânico e 32 (rendimento de 3,2% p/p) g de extrato etanólico. Foi retirado 3,0 g do extrato hexânico e o mesmo foi submetido a coluna cromatográfica por gradiente de eluição. Utilizou-se a sílica como fase estacionária e os solventes hexano, diclorometano e metanol, nas seguintes concentrações (seguindo esse gradiente de polaridade, com volume de 100 ml para cada coleta) : hexano 100%; hexano:clorofórmio (90:10); hexano:clorofórmio (75:25); hexano:clorofórmio (50:50); hexano:clorofórmio (25:75); clorofórmio 100% e metanol 100%.

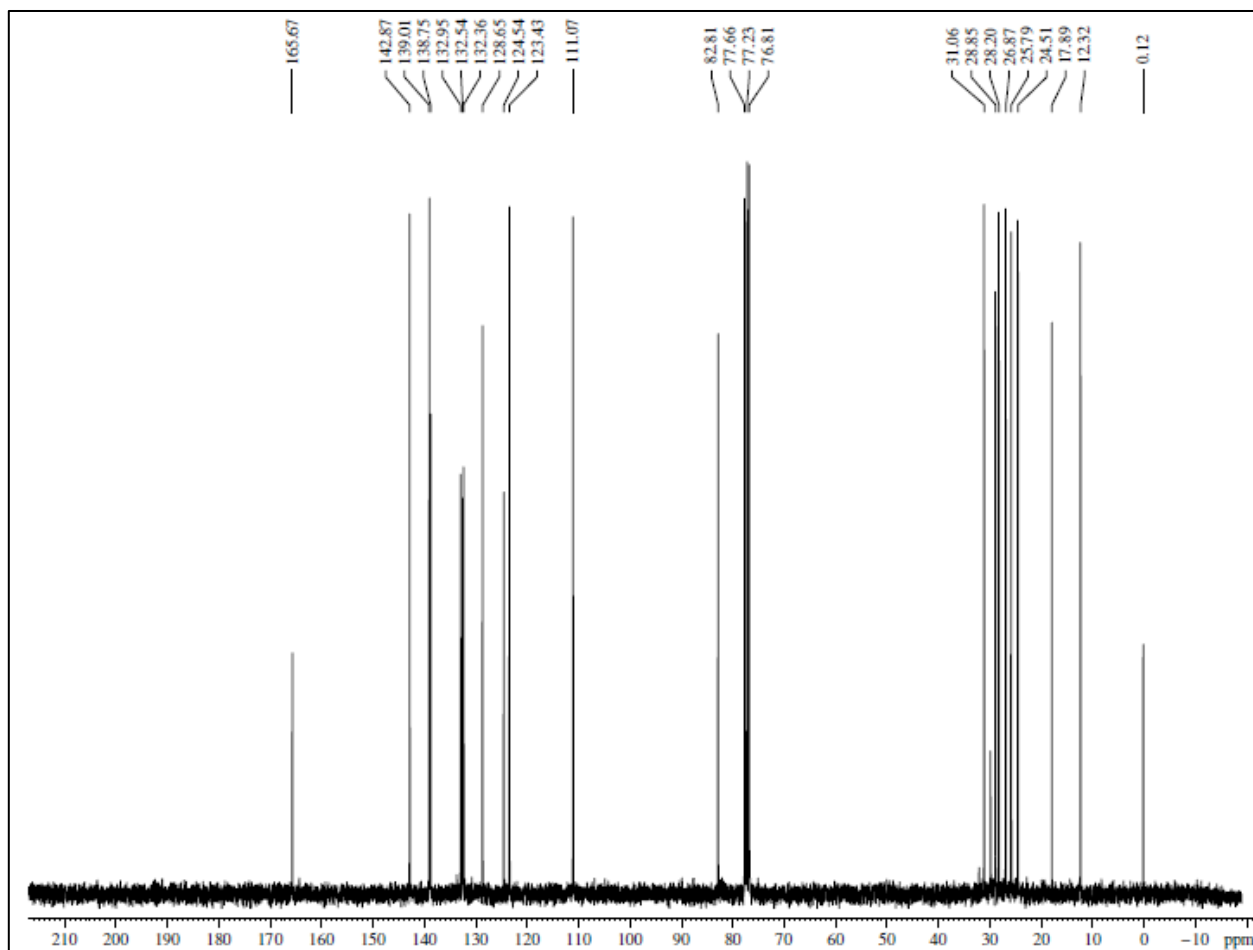
Após observação por cromatografia em camada delgada (CCD), a fração hexano:clorofórmio (50:50) foi seca, obtendo-se 600 mg de material, resultando em um rendimento de 20%, que foi encaminhado ao Centro Nordestino de Aplicação e uso da Ressonância Magnética Nuclear (CENAUREMN), onde foram realizados os espectros de hidrogênio e carbono-13. Da mesma forma, foram retirados 2,0 g do extrato etanólico e o mesmo foi submetido a coluna cromatográfica por gradiente de eluição. Utilizou-se a sílica como fase estacionária e os solventes hexano, diclorometano e metanol, nas seguintes concentrações (seguindo esse gradiente de polaridade, com volume de 100 ml para cada coleta): hexano 100%; hexano:clorofórmio (90:10); hexano:clorofórmio (75:25); hexano:clorofórmio (50:50); hexano:clorofórmio (25:75); clorofórmio 100% e metanol 100%. A fração hexano:clorofórmio (50:50) foi seca e obteve-se 182 mg de material, resultando em um rendimento de 9,1%, que foi levado ao CENAUREMN para a realização dos espectros de ressonância magnética nuclear do hidrogênio e do carbono-13.

Através de análise dados de Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio (RMN- $^1\text{H}$ - **figura 9, pág. 65**) e carbono-13 (RMN- $^{13}\text{C}$ - **figura 10, pág. 66**), e com auxílio da literatura, foi possível determinar a estrutura química do componente majoritário do extrato etanólico de *E. viscosa*, o diterpeno furânico de nome químico 5,6-Dihidro-3-(4-metil-3-pentenil)-6-[1-metil-4-(3-furânil)-1-butenil]-2H-piran-2-ona, ou conizaleucolídeo A, de fórmula molecular e estrutura química listadas abaixo (**figura 11, pág. 66**):

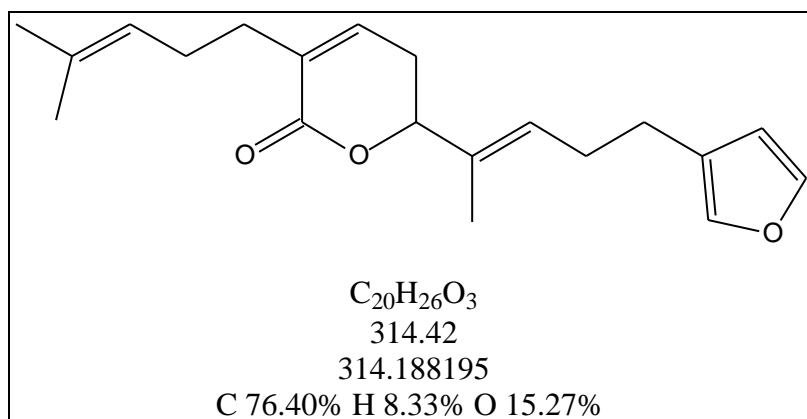
**Figura 9:** Espectro de RMN- $^1\text{H}$  do diterpeno CZA (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).



**Figura 10:** Espectro de RMN-<sup>13</sup>C-BB do diterpeno CZA (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>).



**Figura 11:** Estrutura química e fórmula molecular do diterpeno conizaleucólídeo A (CZA)



## 4.2 Animais

Em todos os experimentos foram utilizados camundongos albinos da espécie *Mus musculus* da variedade *Swiss*, adultos, do sexo masculino, pesando entre 20-25 g (n= 7 ou 8, por grupo), provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará. Os animais foram mantidos em caixas de propileno em uma sala com a temperatura de  $25 \pm 1$  °C e submetidos ao ciclo claro/escuro de 12 em 12 h onde receberam ração do tipo Purina e água *ad libitum*. Os protocolos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal (CEPA) desta universidade, através do protocolo de número 14/2012.

## 4.3 Preparo das drogas

Ambas as drogas foram emulsificadas em Tween 80 a 2% e diluída em solução salina, obtendo-se a concentração final de 10 mg/mL que foram administradas nas doses de 100 e 200 mg/kg o extrato etanólico e 25 e 50 mg/kg o CZA, respectivamente. A escolha das doses foi selecionada de acordo com trabalhos anteriores utilizando-se extratos vegetais e constituintes isolados (OLIVEIRA, 2012). Os grupos controles receberam veículo (salina com Tween 80 a 2%). As demais drogas utilizadas nos experimentos foram dissolvidas e diluídas diretamente em salina.

## 4.4 Tratamento dos grupos experimentais

Foram utilizados dois protocolos: um para a triagem inicial, avaliando efeitos comportamentais do extrato etanólico e do diterpeno CZA, onde se realizaram os testes do campo aberto, *rota rod*, labirinto em cruz elevado e nado forçado. O segundo foi realizado após comprovação da atividade antidepressiva pelo teste inicial do nado forçado, onde se utilizou o LPS como indutor do estado depressivo nos testes. Durante essa fase, foram posteriormente realizados testes da supressão de sacarose, do nado forçado frente à inúmeros antagonistas dos

receptores de monoaminas, além do estudo de parâmetros inflamatórios, como os níveis de glutathiona reduzida (GSH) e espécies reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARs), e parâmetros oxidativos, como o teste da mieloperoxidase (MPO) e o teste de nitrito,. Os animais, em jejum de 2 horas, foram tratados agudamente com as drogas nas doses 100 e 200 mg/kg com extrato etanólico (EE100 e EE200) e 25 e 50 mg/kg com conizaleucolídeo A (CZA25 e CZA50), por via oral (v.o.), e submetidos aos testes comportamentais 60 minutos (min) depois das administrações. A droga utilizada como padrão positivo durante a avaliação da atividade antidepressiva foi a imipramina 10 mg/kg, i.p no teste do nado forçado e supressão de sacarose. Como referência ansiolítica foi utilizado diazepam 1 mg/kg, i.p., nos testes do labirinto em cruz elevado, no campo aberto e no *rota rod*, como padrão positivo para atividade sedativa e relaxante muscular, respectivamente. A Avaliação com as drogas aplicadas intraperitonealmente foi realizada 30 minutos após administração. Nos experimentos envolvendo avaliação da participação do estresse oxidativo e da inflamação com o modelo do lipopolissacarídeo LPS, buscou-se avaliar se as drogas eram capazes de reverter e/ou tratar os efeitos similares à depressão. Dessa forma os camundongos foram aleatoriamente divididos em grupos experimentais de oito animais cada . Para o esquema de pré-tratamento , EE (100 ou 200 mg/kg, v.o) , CZA (25 e 50 mg/kg, v.o), IMI (10 mg/kg, i.p), ou salina foram administras as drogas aos animais 60 min antes do LPS (0,5 mg / kg , ip). Para o protocolo de pós-tratamento, os animais separados receberam LPS (0,5 mg / kg, ip), seguida do tratamento com EE (100 e 200 mg / kg , v.o) , CZA (25 e 50 mg/kg, v.o), IMI (10 mg / kg , ip) ou solução salina no tempo de 1,5 e 23,5 h após a aplicação de LPS . O **quadro 6** abaixo demonstra os dois modelos de administração das drogas. As doses das drogas foram selecionadas com base em estudos pré-clínicos avaliando o seu efeito neuroprotector. A dose IMI foi selecionado a partir da literatura anterior avaliando os seus efeitos do tipo antidepressivo em camundongos (BERROCOSO *et al* , 2013).

**Quadro 6:** Esquema demonstrativo da administração das drogas

Administração das drogas PRÉ e PÓS aplicação de LPS
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Pré LPS – 1 hora antes da aplicação de LPS</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Pós LPS – 1,5 hora e 23,5h após aplicação de LPS</li> </ul>

## 4.5 Protocolo Experimental

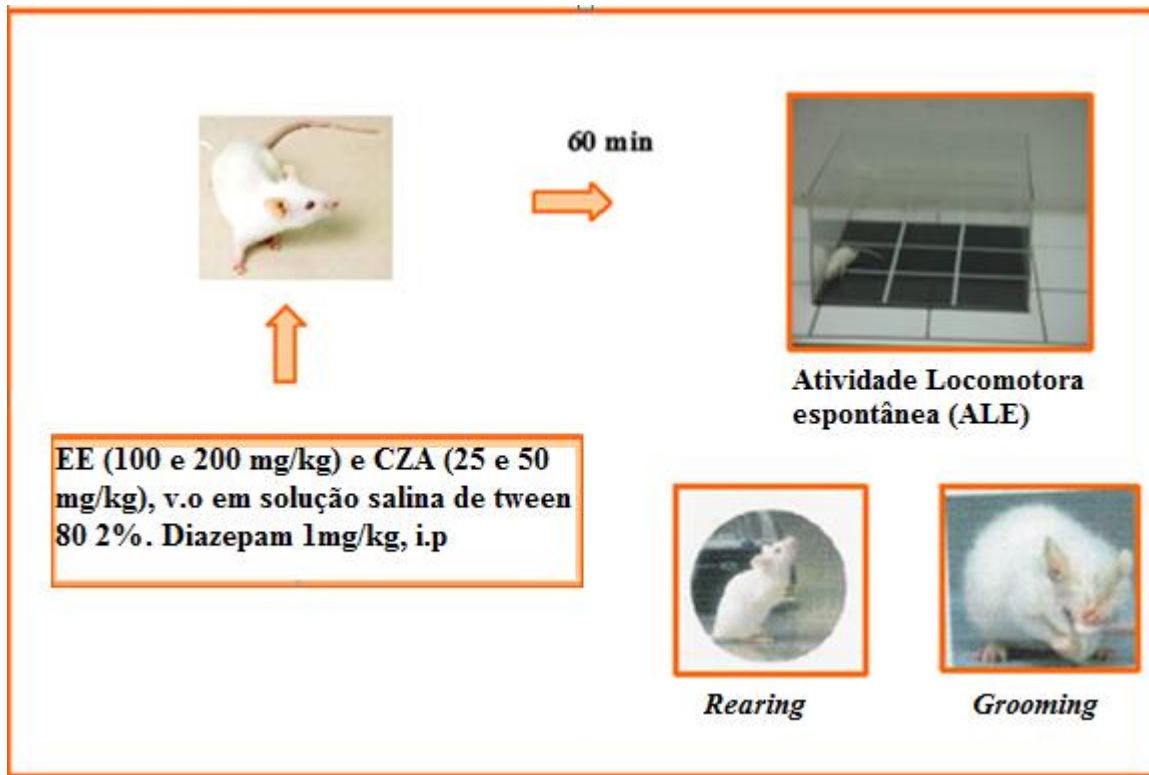
Os experimentos foram realizados durante o período compreendido entre 08 e 12 horas da manhã, e os animais foram observados em um ambiente fechado, silencioso e à temperatura constante de aproximadamente  $24 \pm 1^\circ \text{C}$ . Para os testes do campo aberto e do labirinto em cruz elevado foi utilizado iluminação de baixa densidade (lâmpada vermelha de 15 W) para reduzir a influência ambiental no comportamento exploratório. Os demais experimentos foram realizados com iluminação normal. Todos os testes comportamentais foram realizados com diferentes grupos de animais e em dias distintos. Em todos os testes, com exceção apenas do nado forçado, após a observação de cada animal, foi utilizado álcool 10% (v/v) para a remoção de resíduos e odor do animal do aparato, após a observação de cada animal (ARCHER,1973).

## 4.6 Metodologias Comportamentais

### 4.6.1 Teste do Campo Aberto

Este teste foi realizado para avaliar a atividade exploratória do animal. O aparato para camundongos é feito de acrílico (paredes transparentes e piso preto, 30 x 30 x 15 cm) e dividido em 9 quadrantes iguais. Após 30 ou 60 minutos dos tratamentos i.p. ou v.o., respectivamente, os animais, um por vez, foram colocados no centro do campo aberto onde foram registrados o número de cruzamentos com as quatro patas (atividade locomotora espontânea; ALE), número de comportamentos de auto-limpeza (*grooming*) e o número de levantamentos (*rearing*), sem se encostar nas paredes, durante um tempo de 5 minutos (ARCHER,1973) . O **Quadro 7**, na página 70, mostra o esquema de realização do teste do campo aberto, desde a administração das drogas até a realização do teste. Os animais foram submetidos ao teste do *rota rod* posteriormente.

**Quadro 7:** Esquema do teste do campo aberto

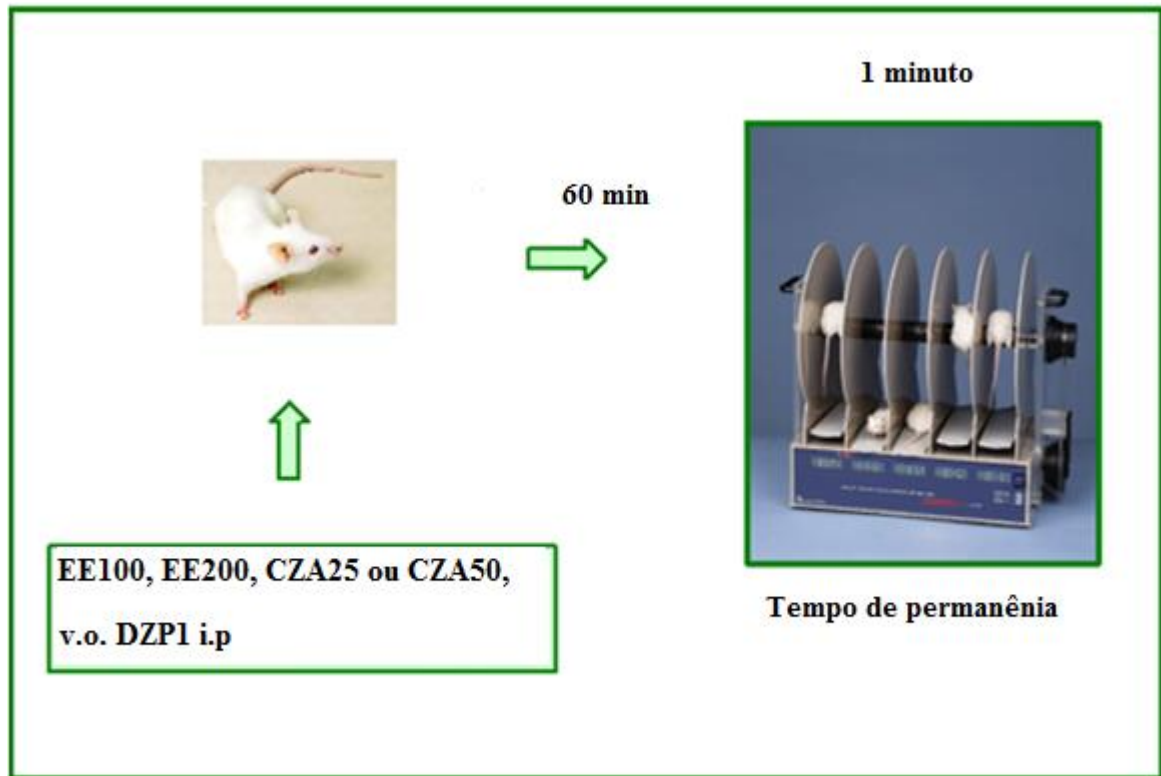


Fonte: Adaptado de Oliveira, 2012.

#### 4.6.2 Teste da Barra Giratória (*Rota Rod*)

O teste do *rota rod* avalia o efeito de relaxamento muscular ou incoordenação motora produzidos por drogas em animais (CARLINI, 1979). Para este teste, os camundongos foram colocados com as quatro patas sobre uma barra de 2,5 cm de diâmetro, elevada a 25 cm do piso, em uma rotação de 12 rpm, por um período de 1 minuto. Foi registrado o tempo de permanência na barra giratória, em segundos (s) (DUNHAM, 1957). O **Quadro 8, pág. 71**, mostra o esquema de realização do teste da barra giratória, desde a administração das drogas até a realização do teste.

**Quadro 8:** Esquema do Teste do *Rota Rod*



Fonte: adaptado de Oliveira, 2012.

#### 4.6.3 Teste do Labirinto em Cruz Elevado (LCE) (*Plus maze*)

O método do Labirinto em Cruz Elevado (LCE) nos permite inferir sobre o potencial efeito ansiolítico ou ansiogênico de uma substância. O LCE consiste de dois braços abertos opostos (30 x 5 cm) e dois fechados (30 x 5 x 25 cm), também opostos, em forma de cruz. Os braços abertos e fechados estão conectados por uma plataforma central (5 x 5 cm). O aparelho está elevado a uma altura de 45 cm do nível do chão. Após 30 ou 60 minutos dos tratamentos i.p. ou v.o., respectivamente, os animais foram colocados no centro do aparelho com a cabeça voltada



para um dos braços fechados e o seu comportamento observado por 5 minutos. As medidas comportamentais registradas durante o experimento foram: número de entradas e o tempo despendido em ambos os braços, abertos e fechados (LISTER, 1987) .

Para análise estatística dos dados e confecção dos gráficos, são considerados apenas os parâmetros relacionados aos braços abertos. Para isso, a percentagem de entradas nos braços abertos é calculada dividindo-se o número (frequência) de entradas nos braços abertos pelo número (frequência) total de entradas (obtida pela soma simples das frequências de entradas nos braços abertos e nos fechados). Esse índice obtido é multiplicado por 100. De maneira semelhante, é calculada a percentagem do tempo em que os animais permanecem nos braços abertos (**Quadro 9, pág. 72**).

Dessa forma, os parâmetros levados em consideração para análise estatística são:

- Número de entradas nos braços abertos (NEBA);
- Número de entradas nos braços fechados (NEBF);
- Tempo de permanência nos braços abertos (TPBA);
- Tempo de permanência nos braços fechados (TPBF);
- Percentagem de entrada nos braços abertos (PEBA);
- Percentagem do tempo de permanência nos braços abertos (PTBA).

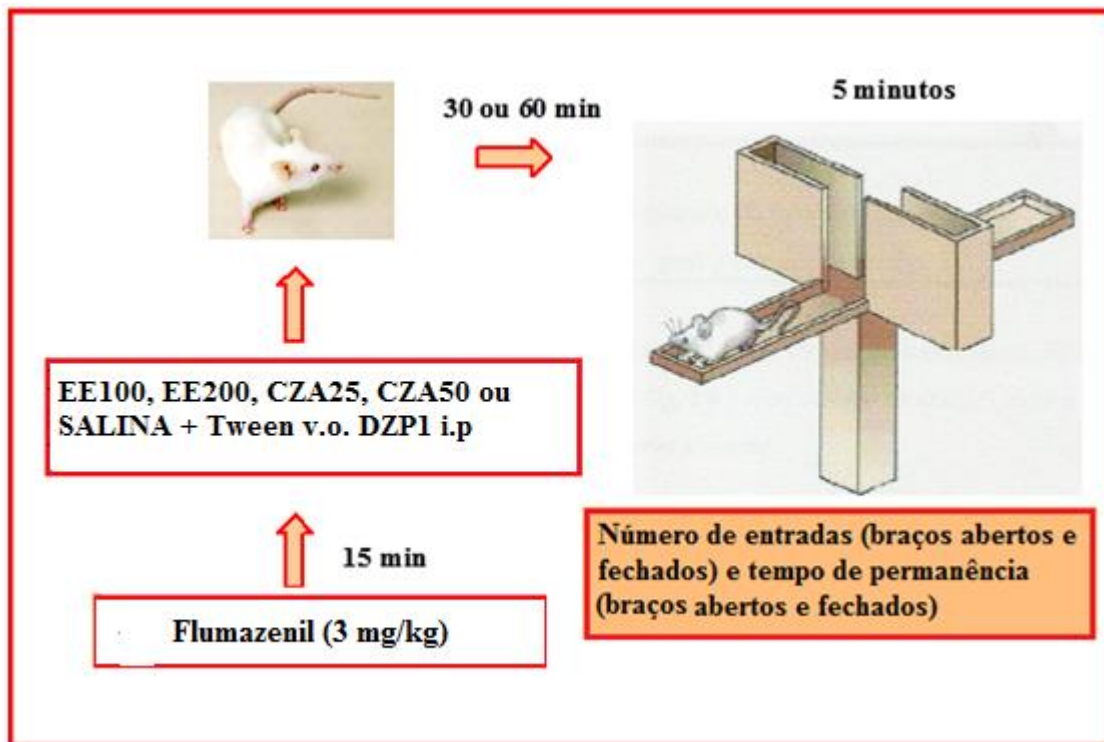
**Quadro 9** - Cálculo dos parâmetros PEBA e PTBA do LCE

<b>Cálculo do PEBA e PTBA</b>	
<b>% entrada nos braços abertos (PEBA)</b>	<b>% tempo de permanência nos braços abertos (PTBA)</b>
$PEBA = \frac{NEBA \times 100}{(NEBA + NEBF)}$	$PTBA = \frac{TPBA \times 100}{(TPBA + TPBF)}$

Posteriormente, com a finalidade de investigar o possível envolvimento do receptor GABA<sub>A</sub>/ Benzodiazepínico no efeito ansiolítico da droga teste, pré-tratamos os animais com

flumazenil (FLU) 3 mg/kg, i.p., um antagonista do receptor GABA<sub>A</sub>/ Benzodiazepínico. Em seguida, agrupamos os animais em dois grupos diferentes. Enquanto um grupo recebeu veículo v.o. (FLU3 + veículo) 15 minutos depois do pré-tratamento, outros dois receberam EE 100 ou 200 mg/kg v.o. (FLU3 + EE-100/200), enquanto dois outros grupos receberam CZA 25 ou 50 mg/kg v.o. Além disso, o flumazenil foi adicionado ao grupo controle positivo, diazepam (1mg/kg), sendo este último administrado via intraperitoneal 15 minutos após a aplicação do antagonista gabaérgico flumazenil (FLU3 + DZP 1). Após 60 min, os dois grupos experimentais foram conduzidos ao labirinto. Para análise estatística, o grupo (FLU3 + EE-100/200) foi comparado com o grupo EE-100/200, v.o., enquanto que os demais grupos foram comparados aos respectivos controles.

**Quadro 10:** Esquema do Teste do Labirinto em Cruz Elevado



Fonte: adaptado de Oliveira, 2012.

## **4.7 Avaliação da Atividade Antidepressiva**

### **4.7.1 Teste do Nado Forçado (TNF)**

O Teste do Nado Forçado (TNF) nos permite avaliar o tempo de imobilidade animal. Para o experimento foram utilizados tanques de 22 cm de diâmetro e 40 cm de altura contendo água fresca a  $23 \pm 1^\circ \text{C}$  até a metade do tanque, cerca de 20 cm. A indução do estado depressivo foi realizado com a aplicação de LPS 0,5 mg/kg via i.p. Após decorridos 30 minutos do uso do LPS, realizou-se o tratamento com as drogas (EE100, EE200, CZA25, CZA50, IMI10 ou salina) por via oral. Após 60 minutos do tratamento v.o., os animais foram colocados, um por vez, no tanque onde o tempo de imobilidade (s), foi contado durante cinco minutos. O animal foi considerado imóvel quando permaneceu flutuando na água, fazendo apenas movimentos suaves necessários para manter a cabeça acima da água (PORSOLT *et al*, 1977).

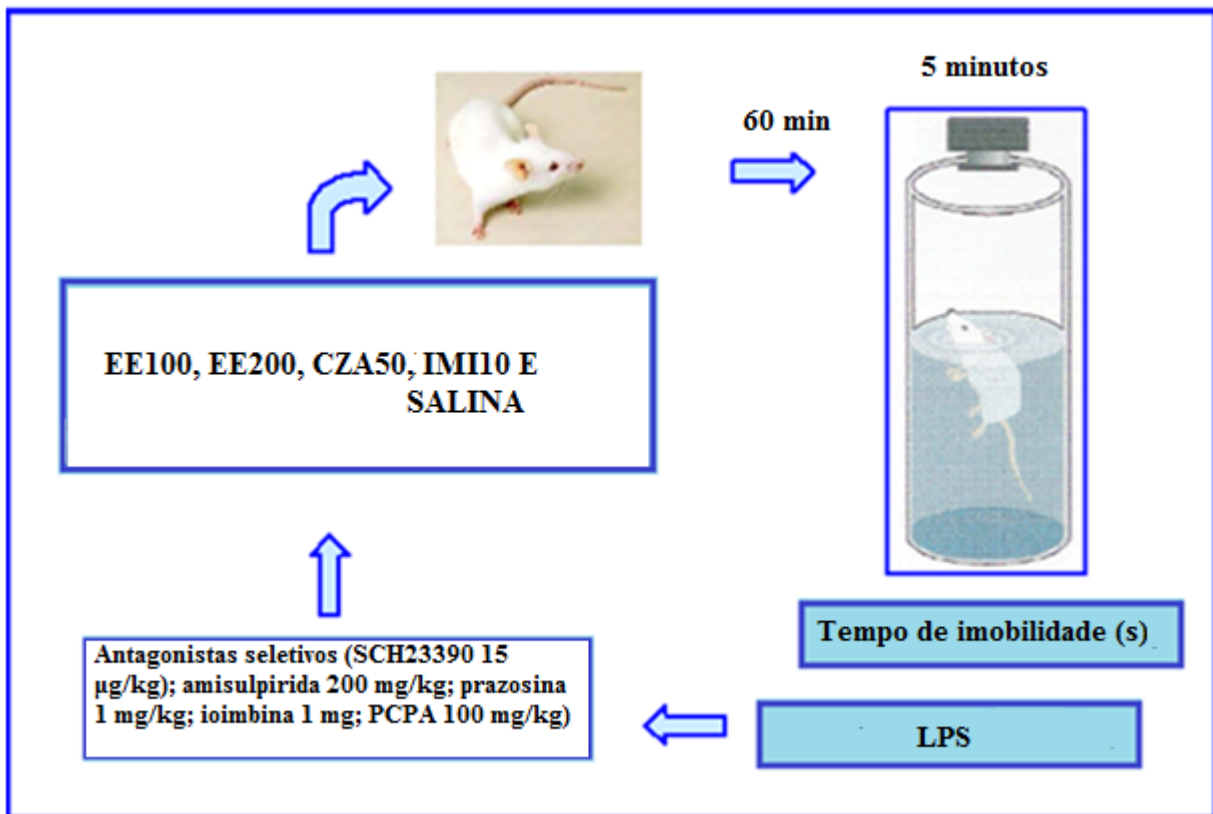
### **4.7.2 Investigação de possíveis mecanismos relacionados ao efeito antidepressivo do extrato etanólico e do conizaleucolideo A no teste do nado forçado.**

Para investigar o possível envolvimento dos sistemas dopaminérgico e noradrenérgico no efeito antidepressivo da droga teste, os animais foram, após indução do estado semelhante à depressão com o LPS, pré-tratados com o SCH23390 (15  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , i.p., um antagonista do receptor dopaminérgico  $D_1$ ), amisulpirida (200 mg/kg, ip, um antagonista do receptor dopaminérgico  $D_2$ ), prazosina (1 mg/kg, i.p., um antagonista do receptor adrenérgico- $\alpha_1$ ) ou ioimbina (1 mg/kg, i.p., um antagonista do receptor adrenérgico  $\alpha_2$ ), e após 30 min, receberam os materiais em estudo (EE100, EE200, CZA50, IMI10) ou o controle (salina + tween 80 2%). Passados 60 minutos, os animais foram avaliados no teste do nado forçado.

Para a investigação do possível envolvimento do sistema serotoninérgico no efeito anti-imobilidade do EE e CZA, os animais foram, após indução do estado semelhante à depressão

com o LPS, pré-tratados com p-clorofenilalanina (PCPA) (100 mg/kg, um inibidor da síntese da serotonina), ou salina, uma vez por dia, durante 4 dias consecutivos. Vinte e quatro horas após a última injeção de salina ou de PCPA, os animais foram tratados com as drogas (EE100, EE200, CZA50, v.o; IMI10, i.p.) ou controle e 60 minutos depois, foram testados no teste do nado forçado.

**Quadro 11:** Esquema do Teste do Nado Forçado (TNF)



Fonte: adaptado de Oliveira, 2012.

#### 4.7.3 Preferência de sacarose

Para avaliar a preferência por sacarose, foram fornecidas duas soluções aos camundongos do tipo Swiss, uma contendo água e a outra contendo água suplementado com 3 % de sacarose, em tubos cônicos de 200 mL equipados com tampas vedadas. Antes do início do

teste, todos os camundongos foram aclimatados para se habituarem a presença das duas garrafas. Todos os ratos beberam tanto a água quanto a solução de sacarose a 3 % (g/L de água), mas preferiram beber a sacarose ao invés da água. No dia do experimento, os animais foram privados de alimentos e de líquidos 2 h antes do ensaio. No início da fase de escuro, a água potável e a solução de sacarose 3% foram colocados na gaiola de alojamento durante a tarde ( 15 h ) . No final de cada período de teste, o conteúdo dos tubos conicos foi pesado. Pesaram-se os tubos e a preferência de sacarose foi determinada utilizando a equação : consumo de sacarose fluido / Total consumo (água + consumo de sacarose )  $\times$  100 (MAO, 2014).

#### **4.8 Determinações neuroquímicas**

As determinações neuroquímicas foram realizadas no córtex pré-frontal, hipocampo e núcleos da base, áreas intimamente relacionadas com a neuropatologia da depressão, visando encontrar alterações significativas nos parâmetros avaliados. Depois da morte dos animais, os encéfalos foram retirados e rapidamente colocados sobre papel alumínio em placa de Petri com gelo. Para a retirada do Córtex pré-frontal (CPF), a porção anterior dos lobos frontais (em torno de 1,5 mm a partir do bulbo olfatório) foi removida e feita uma secção bilateral com o auxílio de uma tesoura de microdissecação (MACHADO, 2000). Após a retirada do CPF, acompanhando a fissura sagital mediana, a camada cortical cerebral foi rebatida das leptomeninges com o auxílio de uma pinça reta de microdissecação, a qual, progredindo delicada e tangencialmente aos ventrículos laterais, divulsionou o córtex em toda a sua extensão fronto-occipital. O córtex já divulsionado foi rebatido para os lados, expondo a região hipocampal (HC) e parte do corpo estriado (CE). O hipocampo e o corpo estriado foram isolados das estruturas circunjacentes por divulsionamento com uma tesoura de microdissecação, sendo a retirada orientada pelo diâmetro da porção tuberosa visível desses núcleos, após o rebatimento lateral do córtex (BURKE; GREENBAUN, 1987).

##### **4.8.1 Determinação dos níveis de glutathiona reduzida (GSH)**

A redução dos níveis de glutathiona foi avaliado para estimar defesas endogenas contra o estresse oxidativo. O método é baseado na reação de reagente de Ellman (DTNB) com os grupos tiol livres (Ellman, 1959). As áreas do cérebro foram diluídos em tampão de EDTA 0,02 M ( 10

% w / v) e adicionado a uma solução de ácido tricloroacético a 50 % . Após centrifugação ( 3000 rpm / 15 min ) , o sobrenadante do homogenato foi recolhido e misturado com tampão de 0,4 M tris-HCl , pH 8,9 e 0,01 M do ácido 5,5-ditio-bis(2-nitrobenzóico - DTNB ) . A cor amarela resultante foi imediatamente lida a 412 nm usando um espectrofotômetro (Beckman Coulter UV / Visível) . Os resultados foram calculados com base em uma curva padrão de glutathione e expressa como ng de GSH / g de tecido úmido.

#### **4.8.2 Níveis de espécies reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS)**

A formação de peróxidos de lípidios foi analisada através da medida da reação da substância reativa do ácido - tiobarbitúrico ( TBARS ) nos homogenatos (Draper et al., 1993) como um índice de produção de espécies reativas de oxigênio (ROS). As amostras foram misturadas com 1 mL de ácido tricloroacético a 10 % (TCA) e 1 mL de ácido tiobarbitúrico a 0,67 % ( TBA), depois aqueceu-se num banho de água fervente durante 15 min e imediatamente após mantido frio num banho de gelo. A peroxidação lipídica foi avaliada pela absorbância a 532 nm e expressa em mmol de malonaldeído ( MDA )/g de tecido.

### **4.9 Avaliação da resposta inflamatória.**

#### **4.9.1 Ensaio da mieloperoxidase (MPO)**

A mieloperoxidase (MPO) é uma enzima presente nos grânulos de neutrófilos. Essa enzima é utilizada como indicador de processo inflamatório, mais especificamente, como marcador de migração nas amostras de tecido. O radical oxigênio ( $O^{\cdot}$ ) resultante se combina com diidrocloreto de  $\theta$ -dianisidina que é convertido a um composto colorido. O aparecimento deste composto, ao longo do tempo, é medido por espectrofotômetro para determinar o conteúdo de MPO do ensaio (BRADLEY, 1982).

Imediatamente após a decapitação, as áreas cerebrais foram homogeneizadas (50 mg/ml) em uma solução de brometo de hexadeciltrimetilamônio 0,5% (HTBA) em tampão fosfato 50

mM, pH 6,0. Em seguida, os homogenatos foram centrifugados (14000 rpm, 4 °C) por 2 minutos. Foram retirados 30 uL do sobrenadante da amostra e adicionados a placa de ELISA juntamente com 200 uL da solução contendo 0,167 mg/ml de hidrocloreto de  $\epsilon$ -dianisidina e 0,0005% de peróxido de hidrogênio. A absorbância foi medida nos tempos 0 e 3 minutos com comprimento de onda de 460 nm (BRADLEY, 1982).

#### 4.9.2 Ensaio de nitritos

Esta determinação baseou-se no método descrito por Green (GREENN *et al*, 1982). O ensaio foi baseado na reação de Griess para determinar a produção de NO. Resumidamente, 100 ml de sobrenadante foi incubado com 100 mL de reagente de Griess, que consiste em partes iguais ( 1 : 1 : 1 : 1 ) 1 % de sulfanilamida dissolvido em de  $H_3PO_4$  , 0,1% de N-( 1- naftilo )-tilenodiamina, ácido clorídrico e de água destilada à temperatura ambiente durante 10 min . A absorbância foi medida a 560 nm em um leitor de microplacas .O teor de nitrito de sódio foi determinado a partir de uma curva padrão gerada a nitrito usando  $NaNO_2$  ( variando entre 0,75 e 100 mM ) como padrão e foi expressa como mm/mg de tecido ( dados não mostrados na tese ).

#### 4.10 Análise Estatística

Todos os resultados são apresentados como a Média  $\pm$  Erro Padrão da Média (E.P.M.). Os dados foram analisados pelo teste de Análise de Variância (ANOVA) seguido do teste de Student-Newman-Keuls *post hoc*. Os resultados considerados significativos apresentaram  $p < 0,05$ . O programa utilizado foi o GraphPad Prism®, 5ª edição.





**RESULTADOS**

---

---

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Avaliação da Atividade Motora e Ansiolítica

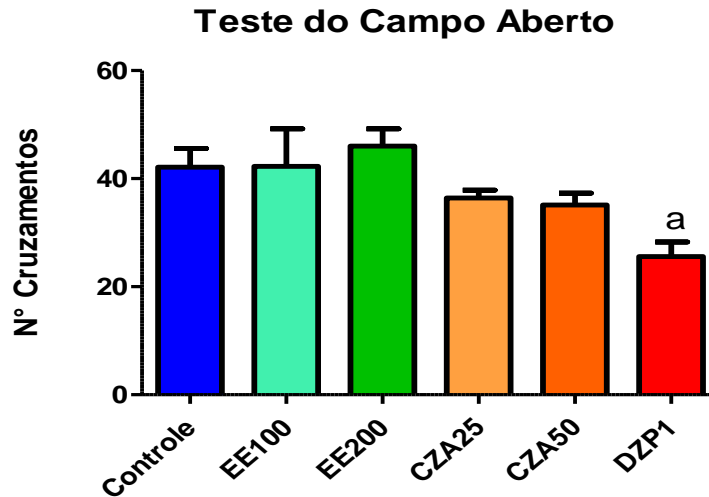
#### 5.1.1 Teste do Campo Aberto

Neste teste os resultados foram expressos como número de cruzamentos, de *rearing* e de *grooming*. Na **Figura 12, pág. 81**, observou-se que os grupos que receberam a administração do extrato etanólico, nas doses de 100 ou 200 mg/kg, bem como CZA nas doses de 25 ou 50 mg/kg, por via oral, não sofreram alteração da atividade locomotora espontânea (ALE) em comparação aos grupos controles, [(v.o.) Controle:  $42,12 \pm 3,44$  (8); EE-100:  $42,28 \pm 6,96$  (8); EE-200:  $47,66 \pm 3,26$  (8)]; CZA-25:  $33 \pm 1,45$  (8); CZA-50:  $32,28 \pm 2,16$  (8) . A administração de diazepam 1 mg/kg, i.p., entretanto reduziu este parâmetro comportamental em relação aos grupos controles [(i.p.) DZP-1:  $24,14 \pm 2,70$ ;  $p < 0,001$ ].

Conforme apresentado na **Figura 13, pág. 81**, o comportamento de *rearing* não foi alterado em nenhuma das doses utilizadas comparado com os respectivos controles [(v.o.) Controle:  $8,85 \pm 1,14$  (8); EE-100:  $9,14 \pm 1,22$  (8); EE-200:  $8,83 \pm 0,83$  (8)]; CZA-25:  $7,71 \pm 0,97$  (8); CZA-50:  $8,14 \pm 0,78$  (8) . A administração de diazepam 1 mg/kg, i.p., entretanto reduziu este parâmetro comportamental em relação aos grupos controles [(i.p.) DZP-1:  $3,42 \pm 0,53$ ;  $p < 0,001$ ].

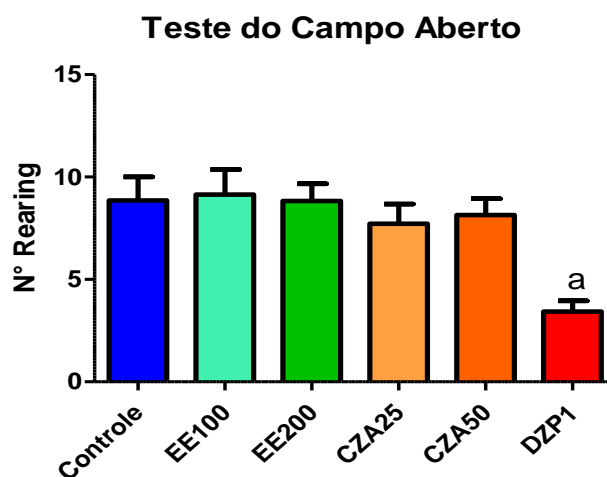
Na **Figura 14** nota-se que o comportamento de *grooming*, em ambas as vias e doses administradas, foi reduzido de maneira significativa [(v.o.) Controle:  $8,0 \pm 1,22$  (7); EE-100:  $4,75 \pm 0,92$  (8); EE-200:  $3,57 \pm 0,87$  (8)]; CZA-25:  $5,57 \pm 1,21$  (8); CZA-50:  $3,28 \pm 0,68$  (7). A redução deste parâmetro também foi observada após o tratamento com diazepam, sendo constatado uma diferença estatisticamente significativa em relação aos grupos controles v.o. [(i.p.) DZP-1:  $1,75 \pm 0,88$ ;  $p < 0,001$ ].

**Figura 12:** Efeito dos extratos etanólico (EE) e do diterpeno conizaleucolídeo A (CZA), via oral, sobre a atividade locomotora espontânea no teste do campo aberto.



Veículo/ Controle (salina), Extrato etanólico (EE; 100 e 200 mg/kg), Conizaleucolídeo A (CZA; 25 e 50 mg/kg) ou diazepam (DZP; 1 mg/kg, i.p.) foram administrados 30 (i.p.) ou 60 min (v.o.) antes das observações comportamentais. Os valores numéricos representam a Média ± EPM do número de travessias durante 5 minutos. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguido por Student Newman Keuls como teste *post hoc*. (\* $p < 0,05$  vs controle).

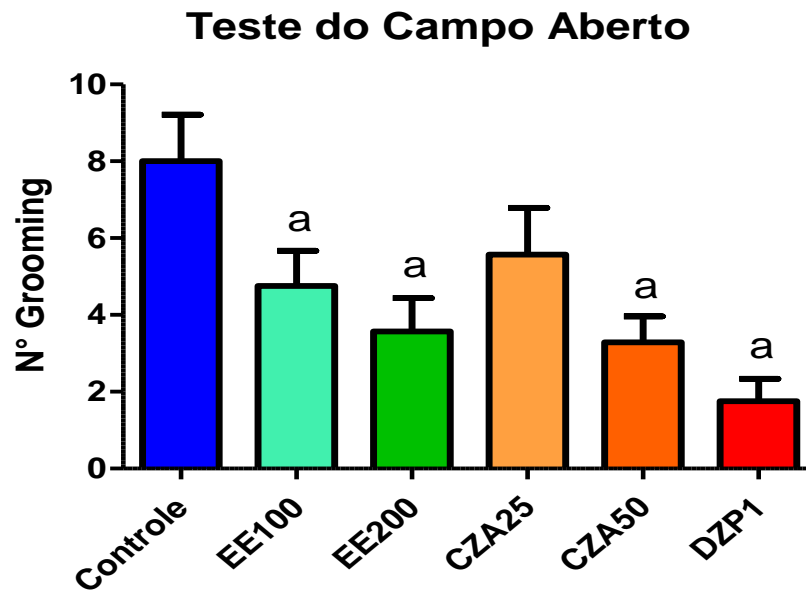
**Figura 13:** Efeito dos extratos etanólico (EE) e do diterpeno conizaleucolídeo A (CZA), sobre o número de *rearing* no teste do campo aberto.



Veículo/ Controle (salina), Extrato etanólico (EE; 100 e 200 mg/kg), Conizaleucolídeo A (CZA; 25 e 50 mg/kg) ou diazepam (DZP; 1 mg/kg, i.p.) foram administrados 30 (i.p.) ou 60 min (v.o.) antes das observações comportamentais. Os valores numéricos representam a Média ± EPM do número de travessias durante 5 minutos.

Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguido por Student Newman Keuls como teste *post hoc*. (\* $p < 0,05$  vs controle).

**Figura 14:** Efeito dos extratos etanólico (EE) e do diterpeno conizaleucolídeo A (CZA), sobre o número de *grooming* no teste do campo aberto.



Veículo/ Controle (salina), Extrato etanólico (EE; 100 e 200 mg/kg), Conizaleucolídeo A (CZA; 25 e 50 mg/kg) ou diazepam (DZP; 1 mg/kg, i.p.) foram administrados 30 (i.p.) ou 60 min (v.o.) antes das observações comportamentais. Os valores numéricos representam a Média ± EPM do número de travessias durante 5 minutos. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguido por Student Newman Keuls como teste *post hoc*. (\* $p < 0,05$  vs controle).

## 5.2 Avaliação da Atividade Relaxante Muscular

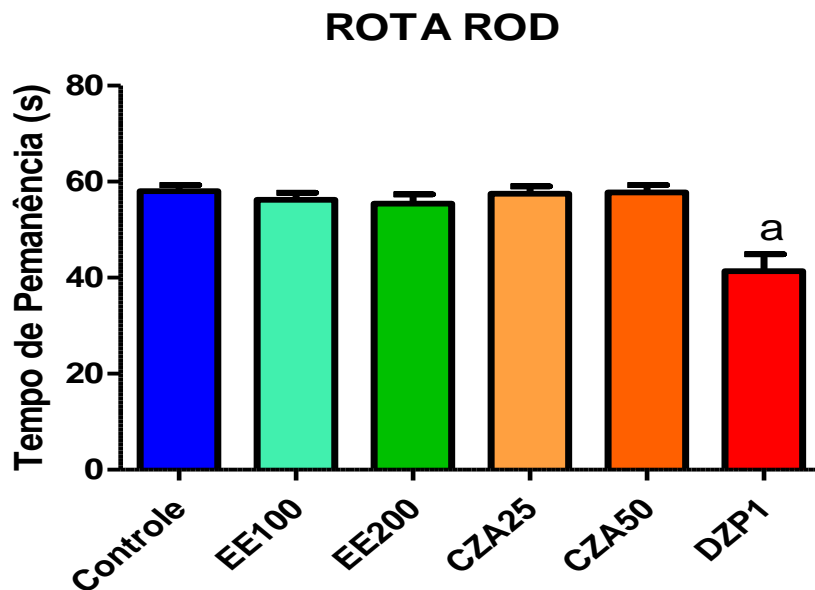
### 5.2.1 Teste do *Rota Rod*

A administração do extrato etanólico (EE) e do diterpeno (CZA) de *E. viscosa* por via oral, não gerou alterações significativas no tempo de permanência (TP) sobre a barra giratória em

relação ao grupo controle [(v.o.) Controle:  $58,0 \pm 1,32$  (8); EE-100:  $56,75 \pm 1,44$  (8); EE-200:  $55,43 \pm 1,95$  (8); CZA-25:  $57,5 \pm 1,51$  (8); CZA-50:  $57,75 \pm 1,52$  (8)].

O diazepam 1 mg/kg, i.p., diminuiu o tempo de permanência na barra [ $41,36 \pm 3,50$  (8),  $p < 0,05$ ] quando comparado aos grupos controles (**Figura 15**).

**Figura 15:** Efeito dos extratos etanólico (EE) e do diterpeno conizaleucolídeo A (CZA), sobre o tempo de permanência no Teste do *rota rod*.



Veículo/ Controle (salina), Extrato etanólico (EE; 100 e 200 mg/kg), Conizaleucolídeo A (CZA; 25 e 50 mg/kg) ou diazepam (DZP; 1 mg/kg, i.p.) foram administrados 30 (i.p.) ou 60 min (v.o.) antes das observações comportamentais. Os valores numéricos representam a Média  $\pm$  EPM do número de travessias durante 5 minutos. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguido por Student Newman Keuls como teste *post hoc*. (\* $p < 0,05$  vs controle).

### 5.3 Avaliação da atividade ansiolítica

#### 5.3.1 Teste do Labirinto em Cruz Elevado (*Plus Maze*)

Neste modelo experimental, a administração aguda de extrato etanólico (EE) nas doses de 100 e 200 mg/kg, por via oral, aumentou de maneira significativa o número de entradas nos braços abertos (NEBA) e o tempo de permanência nos braços abertos (TPBA) em relação ao grupo controle [(NEBA) Controle:  $4,14 \pm 0,42$  (7); EE-100:  $8,28 \pm 0,67$  (7),  $p < 0,001$ ; EE-200:  $8,88 \pm 0,79$  (8),  $p < 0,001$ ; CZA-25:  $7,00 \pm 0,46$  (8); CZA-50:  $7,5 \pm 0,57$  (8)] (**Figura 16**), [(TPBA) Controle:  $52,28s \pm 7,09$  (8); EE-100:  $90,86s \pm 13,02$  (8)  $p < 0,001$ ; EE-200:  $136,14 s \pm 11,40$  (7), CZA-25:  $80 \pm 10,59$  (7); CZA-50:  $100,14 \pm 5,76$  (8)  $p < 0,001$ ] (**Figura 17**). No tocante a porcentagem de entradas nos braços abertos (PEBA) e porcentagem do tempo de permanência nos braços abertos (PTPA), verificou-se um aumento significativo destes parâmetros em comparação ao grupo controle [(PTPA) Controle:  $37,45 \pm 3,88$  (7); EE-100:  $51,67 \pm 2,27$  (7),  $p < 0,001$ ; EE-200:  $57,17 \pm 3,12$  (7),  $p < 0,001$ ; CZA-25:  $42,52 \pm 3,76$  (8); CZA-50:  $58,04 \pm 2,77$  (8)] (**Figura 18**).

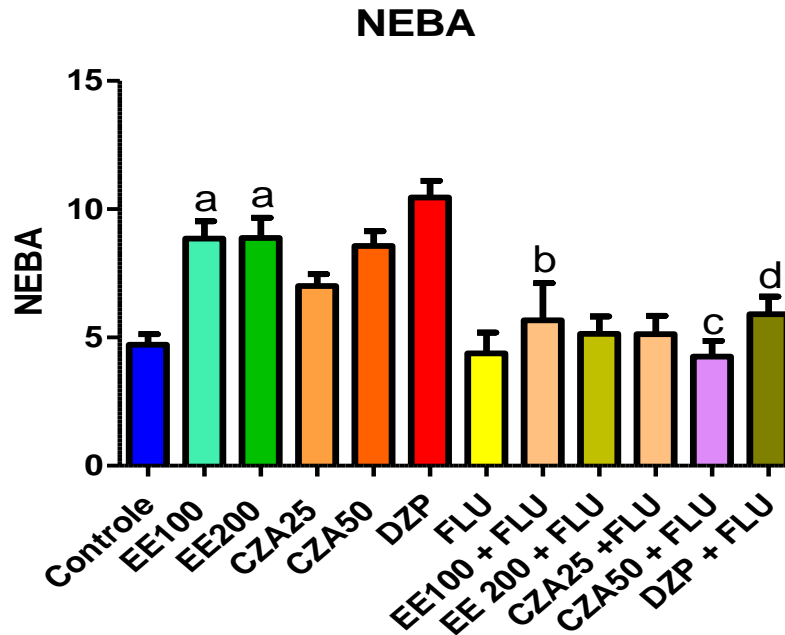
Por sua vez, a administração da droga padrão positivo, o diazepam, na dose de 1 mg/kg, i.p., aumentou os quatro parâmetros acima discutidos de forma significativa ( $p < 0,001$ ) em relação aos controles [(NEBA) DZP:  $10,46 \pm 0,64$  ], [(TPBA) DZP:  $168,7s \pm 5,36$ ], [(PTBA)  $61,27s \pm 2,97$ ] (**Figuras 16-18**).

Em seguida, dada a apresentação do efeito ansiolítico dos extratos etanólico e do diterpeno furânico conizaleucolide A, foi realizada a investigação sobre o possível envolvimento dos receptores benzodiazepínicos do tipo GABA<sub>A</sub>/Benzodiazepínico neste efeito, através da administração de flumazenil. Desta forma foi observado que os grupos previamente tratados com flumazenil e que em seguida receberam o extrato etanólico (EE100 e EE200) ou o diterpeno furânico CZA (CZA25 ou CZA50), por v.o., não apresentaram efeito ansiolítico, enquanto que os grupos tratados apenas com as drogas originais e diazepam, mostraram-se menos ansiosos em relação ao controle. Nas figuras 14 a 17 estes resultados são demonstrados. Veja os parâmetros:

GRUPOS ( EE-100 + FLU, EE-200 + FLU, CZA-25 + FLU e CZA 50 + FLU) - [(NEBA) EE-100 + FMZ : $5,67 \pm 1,45$  (8); EE-200 + FMZ:  $5,14 \pm 0,67$  (8);  $p < 0,001$ ; CZA-25 + FMZ:  $5,12 \pm 0,72$  (7); CZA-50 + FLU:  $4,25 \pm 0,62$  (8)] (**Figura 16**), [(TPBA) EE-100 + FLU : $165,66 \pm 20,55$  (8); EE-200 + FLU:  $69,85 \pm 10,60$  (8);  $p < 0,001$ ; CZA-25 + FLU:  $55,28 \pm 6,33$  (8); CZA-50 + FLU:  $46,28 \pm 5,38$  (8)] (**Figura 17**) , [(PTBA) FLU + EE100:  $32,56 \pm 6,879$   $p < 0,01$  (9); EE100 + FLU:  $27,21 \pm 4,748$   $p < 0,001$  (9)] (**Figura 18**) . GRUPOS (Controle, EE-100, EE-200, CZA-25 e CZA-50) -[(NEBA) Controle:  $4,14 \pm$  (7); EE-100:  $8,28 \pm$  (7),  $p < 0,001$ ; EE-200:  $8,88 \pm$  (8),  $p < 0,001$ ; CZA-25:  $7,00 \pm$  (8); CZA-50:  $7,5 \pm$  (8)] (**Figura 16**), [(TPBA) Controle:  $52,28 \pm 7,09$  (8); EE-100:  $90,86 \pm 13,02$  (8)  $p < 0,001$ ; EE-200:  $136,14 \pm 11,40$  (7), CZA-25:  $80 \pm 5,76$  (7); CZA-50:  $100,14 \pm 5,76$  (8)  $p < 0,001$ .] (**Figura 17**), [(PTPA) Controle:  $37,45 \pm 3,88$  (7); EE-100:  $51,67 \pm 2,27$  (7),  $p < 0,001$ ; EE-200:  $57,17 \pm 3,12$  (7),  $p < 0,001$ ; CZA-25:  $42,52 \pm 3,77$  (8); CZA-50:  $58,04 \pm 2,77$  (8) ] (**Figura 18**) .

De maneira semelhante, a associação (DZP-1 + FLU) impediu a expressão do efeito ansiolítico do diazepam administrado isoladamente: [(NEBA) DZP:  $10,46 \pm 0,6466$  (13); FLU + DZP:  $5,900 \pm 0,6904$  (10);  $p < 0,001$  ] , [(TPBA) DZP:  $168,7 \pm 5,366$  (13); FLU + DZP:  $79,60 \pm 6,515$  (10);  $p < 0,001$  ] , [(PTBA) DZP:  $61,27 \pm 2,974$  (13); FLU + DZP:  $29,41 \pm 2,476$  (10);  $p < 0,001$ ] (**Figura 16 - 18**).

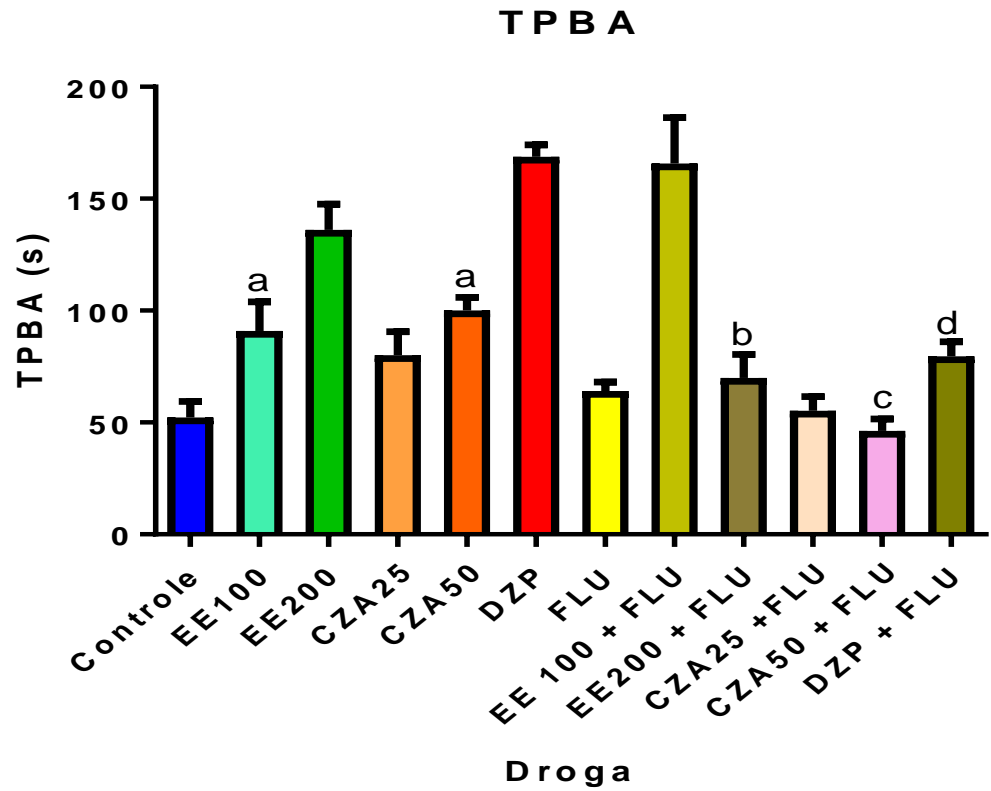
**Figura 16:** Efeito do extrato etanólico de *E. viscosa* e do conizaleucolídeo A, via oral, sobre o número de entradas nos braços abertos (NEBA).



Os valores numéricos representam a Média  $\pm$  EPM dos dois parâmetros analisados durante 5 minutos. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguido por Student Newman Keuls como teste *post hoc*. ( <sup>a</sup>EE100 e EE200 vs controle; <sup>b</sup>EE-200 + FLU vs EE-200, <sup>c</sup>CZA-50 + FLU vs CZA-50, <sup>d</sup>DZP+FLU vs DZP,  $p < 0,05$ ).

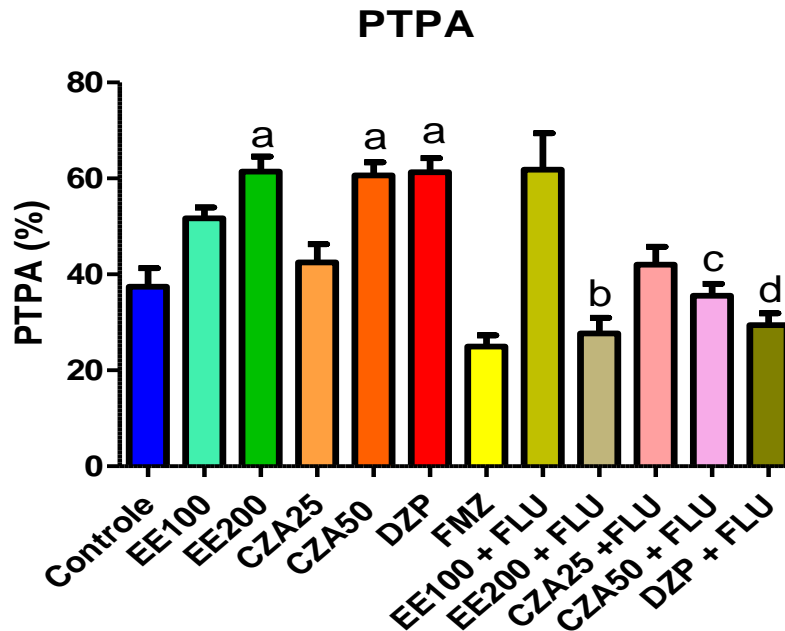


**Figura 17:** Efeito do extrato etanólico de *E. viscosa* e do conizaleucolídeo A, via oral, sobre o tempo de permanência nos braços abertos no teste do labirinto em cruz elevado.



Os valores numéricos representam a Média  $\pm$  EPM dos dois parâmetros analisados durante 5 minutos. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguido por Student Newman Keuls como teste *post hoc*. ( <sup>a</sup>EE100 e CZA50 < 0,05 vs controle; <sup>b</sup>EE-200 + FLU vs EE-200, <sup>c</sup>CZA-50 + FLU vs CZA-50, <sup>d</sup>DZP+FLU vs DZP,  $p < 0,05$ ).

**Figura 18:** Efeito do extrato etanólico de *E. viscosa* e do conizaleucolídeo A via oral, sobre a porcentagem do tempo de permanência nos braços abertos (PTPA) no teste do labirinto em cruz elevado.



Os valores numéricos representam a Média  $\pm$  EPM dos dois parâmetros analisados durante 5 minutos. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguido por Student Newman Keuls como teste *post hoc*. (<sup>a</sup>EE200, CZA50 e DZP vs controle; <sup>b</sup>EE-200 + FLU vs EE-200, <sup>c</sup>CZA-50 + FLU vs CZA-50, <sup>d</sup>DZP+FLU vs DZP-1,  $p < 0,05$ ).

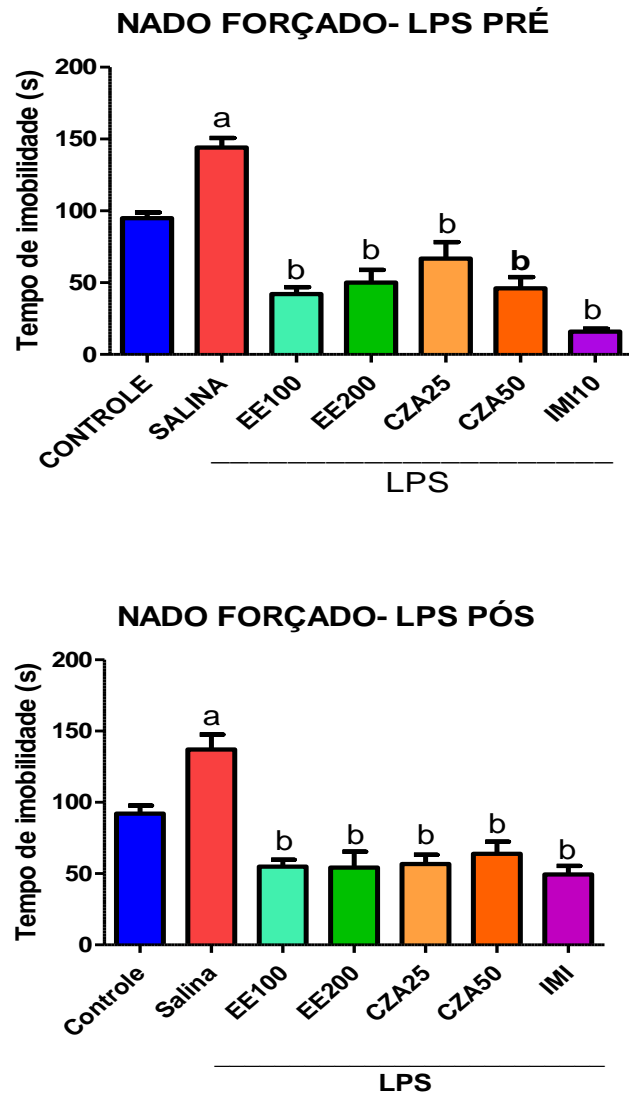
## 5.4 Avaliação da Atividade Antidepressiva

### 5.4.1 Teste do Nado Forçado (TNF)

Neste modelo, a administração oral do extrato etanólico de *E. viscosa* e do conizaleucolídeo A em animais pré-tratados diminuiu significativamente o tempo de imobilidade dos animais tratados em relação aos não tratados. A administração de LPS intraperitoneal gerou um aumento no tempo de imobilidade quando comparado ao controle, sendo esse efeito revertido pelas drogas em estudo [ Controle:  $94.89 \pm 4.08$  (9); Salina:  $144.1 \pm 6.44$ ; EE-100 + LPS:  $42.14 \pm 4.71$  (7) ,  $p < 0.001$ ; EE-200 + LPS:  $50.14 \pm 8.80$  (7),  $p < 0.001$ ; CZA-25 + LPS:  $66.71 \pm 11.48$ ;

CZA-50 + LPS:  $46.00 \pm 7.94$  (7)] (**Figura 19 A**). Um perfil similar de ação foi observado nos grupos tratados intraperitonealmente com imipramina [IMP-10 + LPS:  $16.86 \pm 2.80$  (7) ,  $P < 0.001$ ] (**Figura 19 A e B**). Da mesma forma, o pós-tratamento com as drogas em estudo diminuiu significativamente o tempo de imobilidade em animais tratados com LPS [Controle:  $92.14 \pm 5.54$  (9); Salina:  $137.0 \pm 10.54$  ; EE-100 + LPS:  $54.86 \pm 4.87$  (7) ,  $p < 0.001$ ; EE-200 + LPS:  $54.29 \pm 11.08$  (7),  $p < 0.001$ ; CZA-25 + LPS:  $56.71 \pm 6.60$ ; CZA-50 + LPS:  $63.86 \pm 8.63$  (7). Um perfil similar de ação foi observado nos grupos tratados intraperitonealmente com imipramina [IMP-10 + LPS:  $49.38 \pm 6.01$  (7) ,  $P < 0.001$ ]

**Figura 19:** Efeito do tratamento de camundongos pré-tratados (A) e pós-tratados (B) sobre a redução do tempo de imobilidade induzida pelo tratamento com o extrato etanólico (100 e 200 mg / kg, v.o.) e com o diterpeno furânico CZA (50 mg / kg, v.o) no teste do nado forçado, antes e após aplicação do Lipopolissacarídeo (LPS).



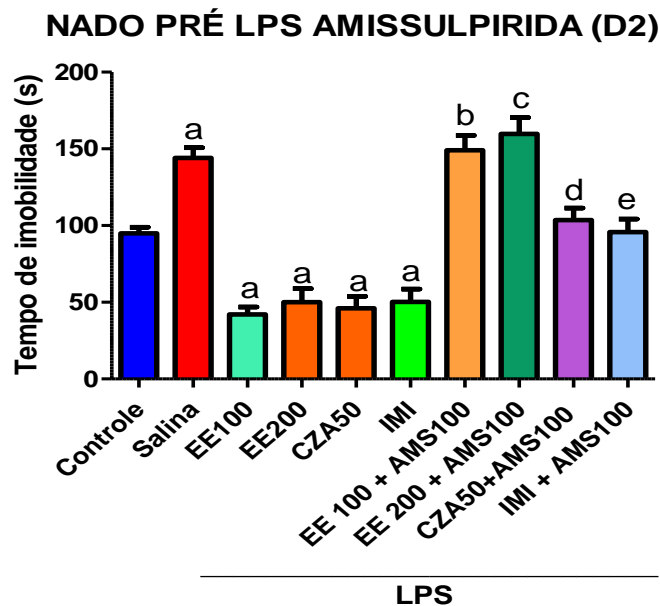
Determinação do tempo de imobilidade em camundongos ( 9 a 7 / grupo ) pré - tratados ( A) e de pós- tratados (B) com extrato etanólico (100 e 200 mg/kg), (CZA 25 e 50 mg/kg) e imipramina (IMI 10 mg/kg) , antes e depois de LPS . Os valores numéricos representam a Média (s)  $\pm$  E.P.M. Os resultados foram analisados por ANOVA seguido por Student-Newman-Keuls como teste post hoc. (<sup>a</sup>Salina vs Controle; <sup>b</sup> vs Salina,  $p < 0,05$ ).

## Investigação de possíveis mecanismos envolvidos no efeito antidepressivo das drogas em estudo no TNF.

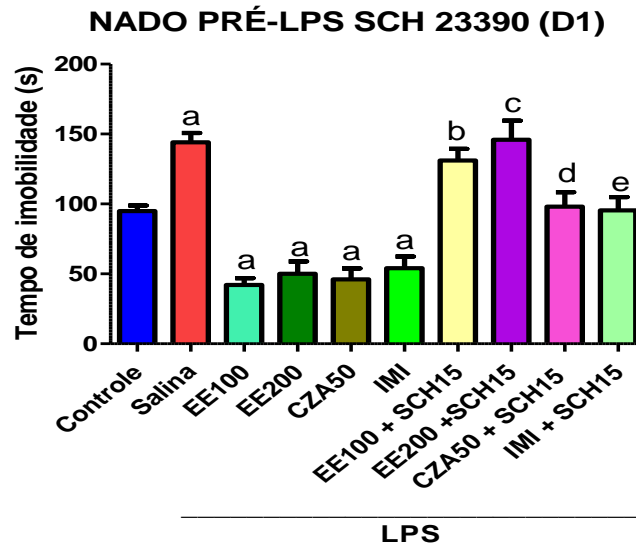
### 5.4.1.1 Envolvimento do sistema dopaminérgico

O efeito anti-imobilidade observado após a administração do extrato etanólico (100 e 200 mg/ kg, v.o.) e do CZA (50 mg/kg) foi significativamente inibido pelo pré-tratamento dos camundongos com amisulpirida (100 mg/kg, ip) (**Figura 20 A**) e SCH23390 (15 µg/kg, ip) (**Figura 20 B**) [Controle:  $94.89 \pm 4.09$  (9); Salina:  $144.1 \pm 6.64$  (8) ; EE100:  $42,14 \pm 4.71$  (7) ; EE100 + AMS100:  $149,14 \pm 6.65$  (8)  $p < 0,001$ ; EE200:  $50,15 \pm 8.80$  (8); EE200 + AMS100:  $159,71 \pm 10.38$  (8); CZA50:  $46 \pm 7.95$  (7); CZA50 + AMS100:  $103,67 \pm 7.70$  (7); EE100 + SCH15:  $131 \pm 8.38$  (8); EE200 + SCH15:  $145,86 \pm 13.74$  (8); CZA50 + SCH15:  $98,14 \pm 10.36$  (8) ;  $p < 0,001$ ].

**Figura 20:** Efeito do pré-tratamento de camundongos com AMS (100 mg/kg, i.p.) (A) ou SCH23390 (15 ug/kg, i.p.) (B) sobre a redução do tempo de imobilidade induzida pelo tratamento com o extrato etanólico (100 e 200 mg/kg, v.o.) e com o diterpeno furânico CZA (50 mg/kg, v.o) no teste do nado forçado.



Os valores numéricos representam a Média (s)  $\pm$  E.P.M. Os resultados foram analisados por ANOVA seguido por Student-Newman-Keuls como teste post hoc. ( <sup>a</sup>  $p < 0,05$  vs CONTROLE; <sup>b</sup>EE100 + AMS100 vs EE100; <sup>c</sup>EE200 + AMS200 vs EE200; <sup>d</sup>CZA50 + AMS100 vs CZA50; <sup>e</sup>IMI + AMS100 vs IMI ).

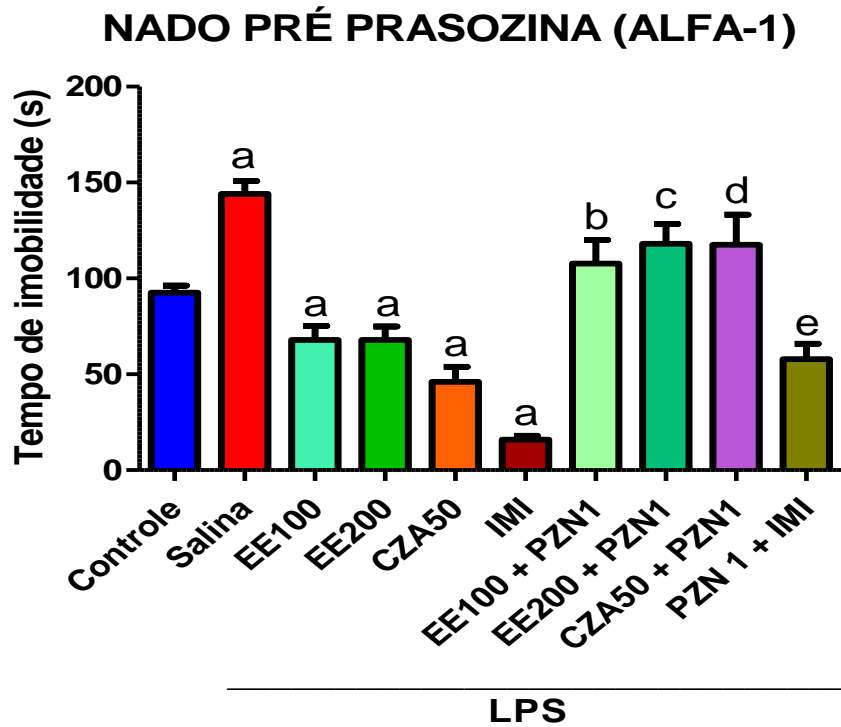


Os valores numéricos representam a Média (s)  $\pm$  E.P.M. Os resultados foram analisados por ANOVA seguido por Student-Newman-Keuls como teste post hoc. ( <sup>a</sup>  $p < 0,05$  vs Controle; <sup>b</sup> EE100 + SCH15 vs EE100; <sup>c</sup> EE200 + SCH15 vs EE200; <sup>d</sup> CZA50 + SCH15 vs CZA50; <sup>e</sup> IMI + SCH15 vs IMI,  $p < 0,05$ ).

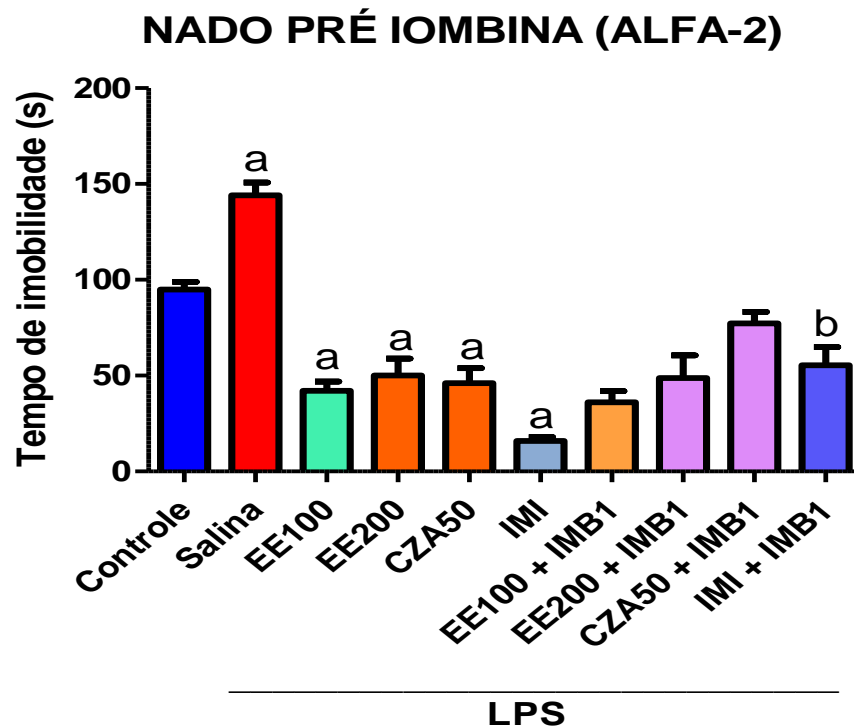
#### 5.4.1.2 Envolvimento do sistema noradrenérgico

Na **Figura 21** observou-se que o pré-tratamento dos camundongos com o antagonista adrenérgico alfa-1 prazosina (PZA 1 mg/kg, i.p.) foi capaz de impedir o efeito antidepressivo símile observado após o tratamento com as drogas derivadas de *E. viscosa* isoladamente (**Figura 21A**). O mesmo resultado não ocorreu após o pré-tratamento com o antagonista noradrenérgico alfa-2 ioimbina (IMB 1 mg / kg , ip) (**Figura 21B**): [Controle:  $94,89 \pm 4,09$  (9); Salina:  $144,1 \pm 6,64$  (8); EE100:  $42,14 \pm (7)$  ; EE100 + PZN1:  $120,43 \pm 17,63$  (7)  $p < 0,001$ ; EE200:  $50,15 \pm 8,80$  (7); EE200 + PZN1:  $118,14 \pm 10,32$  (7); CZA50:  $46 \pm 7,95$  ; CZA50 + PZN1:  $117,57 \pm 15,76$  (8); EE100 + IMB1:  $36 \pm 5,88$  (8); EE200 + IMB1:  $50,14 \pm 11,85$  (8); CZA50 + IMB1:  $46 \pm 9,59$  (8) ;  $p < 0,001$ ]

**Figura 21:** Efeito do pré-tratamento de camundongos com PSZ (1 mg/kg, i.p.) (A) ou IMB (1mg/kg, i.p.) (B) sobre a redução do tempo de imobilidade induzida pelo tratamento com o extrato etanólico (100 e 200 mg/kg, v.o.) e com o diterpeno furânico CZA (50 mg/kg, v.o) no teste do nado forçado.



Os valores numéricos representam a Média (s) ± E.P.M. Os resultados foram analisados por ANOVA seguido por Student-Newman-Keuls como teste post hoc. ( <sup>a</sup> <0,05 vs Controle; <sup>b</sup>EE100 + PZN1 vs EE100; <sup>c</sup>EE200 + PZN1 vs EE200; <sup>d</sup>CZA50 + PZN1 vs CZA50; <sup>e</sup>IMI + PZN1 vs IMI, p<0,05).



Os valores numéricos representam a Média (s) ± E.P.M. Os resultados foram analisados por ANOVA seguido por Student-Newman-Keuls como teste post hoc. (<sup>a</sup> p<0,05 vs Controle; <sup>b</sup>IMI + IMB1 vs IMI).

#### 5.4.1.3 Envolvimento do sistema serotoninérgico

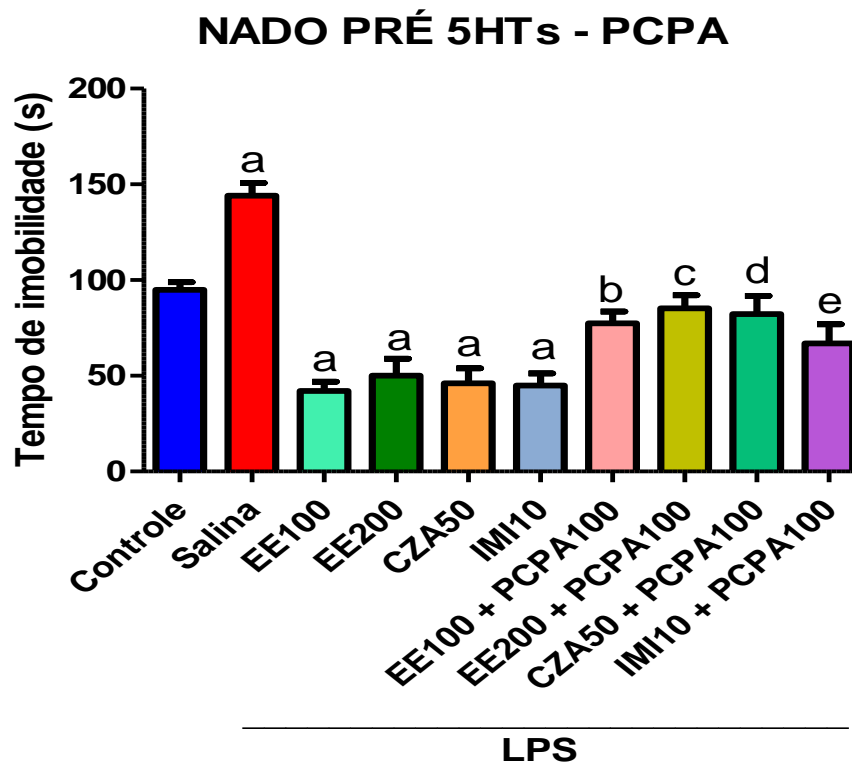
O pré-tratamento com o antagonista da síntese de serotonina PCPA (100 mg/kg, i.p., uma vez por dia durante quatro dias consecutivos) preveniu significativamente a diminuição do tempo de imobilidade observado após a administração do extrato etanólico sozinho (100 e 200 mg/kg), assim como preveniu o mesmo resultado com o diterpênico furânico conizaleucolideo A (50 mg/kg) (**Figura 22A**). De forma semelhante, o pré-tratamento com o antagonista seletivo do receptor serotoninérgico NAN 190 (0,5 mg/kg, i.p.) também o efeito antidepressivo desencadeado pela administração da droga teste sozinha (**Figura 22B**). [Controle: 94.89 ± 4.09 (9); Salina: 144.1 ± 6.64 (8);

EE100: 42,14 ± 4.71 (8) ; EE100 + PCPA: 77,37 ± 6.19 (8) p< 0,001; EE200: 50,15 ± 8.80 (8); EE200 + PCPA100: 85,25 ± 6.84 (8); CZA50: 46 ± 7.95 ;CZA50 + PCPA100: 82,28 ±

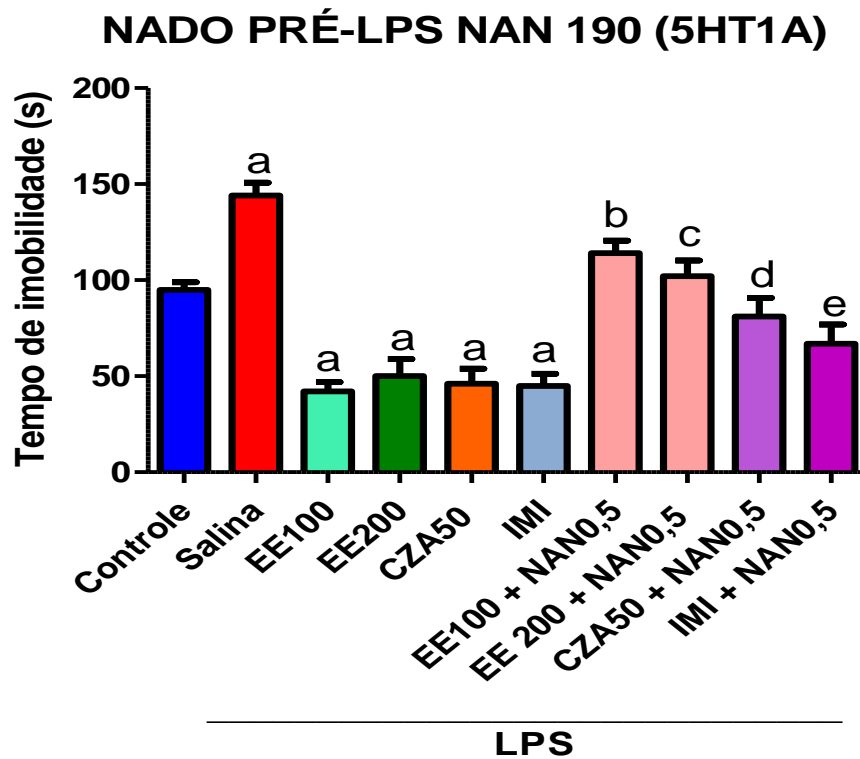


9.45 (8); EE100 + NAN190:  $114 \pm 6.57$  (8); EE200 + NAN190:  $102,14 \pm 8.10$  (8); CZA50 + NAN190:  $81,17 \pm 9.58$  (8) ;  $p < 0,001$ ]

**Figura 22:** Efeito do pré-tratamento de camundongos com PCPA (100 mg/kg, i.p.) (A) ou IOI (0,5 mg/kg, i.p.) (B) sobre a redução do tempo de imobilidade induzida pelo tratamento com o extrato etanólico (100 e 200 mg / kg, v.o.) e com o diterpeno furânico CZA (50 mg / kg, v.o) no teste do nado forçado.



Os valores numéricos representam a Média (s)  $\pm$  E.P.M. Os resultados foram analisados por ANOVA seguido por Student-Newman-Keuls como teste post hoc. (<sup>a</sup>  $p < 0,05$  vs Controle; <sup>b</sup>EE100 + PCPA100 vs EE100; <sup>c</sup>EE200 + PCPA100 vs EE200; <sup>d</sup>CZA50 + PCPA100 vs CZA50; <sup>e</sup>IMI + PCPA100 vs IMI,  $p < 0,05$ ).



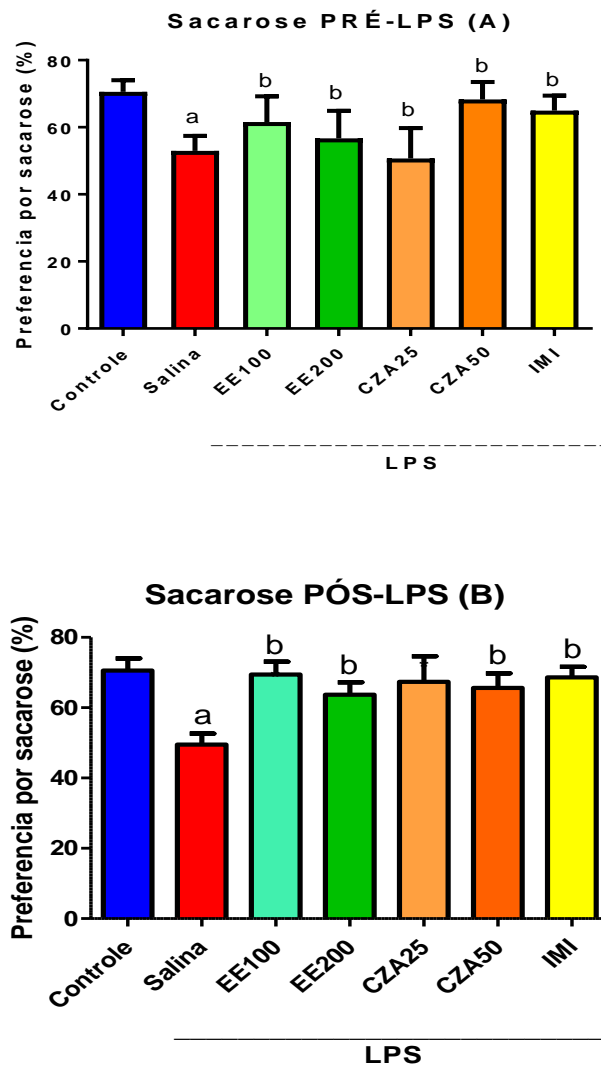
Os valores numéricos representam a Média (s) ± E.P.M. Os resultados foram analisados por ANOVA seguido por Student-Newman-Keuls como teste post hoc. ( <sup>a</sup> p<0,05 vs Controle; <sup>b</sup>EE100 + NAN0,5 vs EE100; <sup>c</sup>EE200 + NAN0,5 vs EE200; <sup>d</sup>CZA50 + NAN0,5 vs CZA50; <sup>e</sup>IMI + NAN0,5 vs IMI, p<0,05).

#### 5.4.2 – Teste da preferência de sacarose

Esse teste avalia anedonia, a falta de prazer apresentado pelo animal, representado pela redução da preferência do animal pela solução contendo sacarose em relação à água pura. Tanto o pré-tratamento como o pós-tratamento com EE100 e EE200 e com CZA25 e CZA50 aumentaram significativamente o consumo das soluções de sacarose em detrimento daquelas contendo apenas água, no teste da preferência de sacarose, quando comparado com o grupo onde se aplicou LPS intraperitoneal (o procedimento experimental do mesmo encontra-se descrito na página 62). [ Pré-tratamento: Controle: 70.56 ± 3.47; Salina: 53.00 ± 4.40; EE100: 68.91 ± 2.63; EE200: 64.46 ± 3.04; CZA25: 62.78 ± 4.95; CZA50: 72.38 ± 3.65. Pós-tratamento: Controle: 70.02 ± 3.45; Salina: 49.51 ± 3.10; EE100: 69.45 ± 3.66; EE200: 63.67 ± 3.58; CZA25: 67.39 ± 7.27; CZA50:

65.61 ± 4.18] . Resultado semelhante foi obtido com a utilização do antidepressivo clássico imipramina, na dose de 10 mg/kg. [Pré-tratamento: IMI1068.64 ± 2.98; Pós-tratamento: IMI: 67.23 ± 3.01].

**Figura 23:** Efeito do extrato etanólico de *E. viscosa* e do conizaleucolídeo A via oral, sobre a porcentagem do consumo de solução de sacarose sobre água pura no teste de preferência por sacarose com administração de LPS antes e depois da administração das drogas.



Determinação dos níveis de preferência por sacarose ( 8/grupo ) pré - tratados ( A ) e de pós-tratados ( B ) com extrato etanólico ( 100 e 200 mg/kg ), ( CZA 25 e 50 mg/kg ) e imipramina ( IMI 10 mg/kg ) , antes e depois de LPS . Os valores numéricos representam a Média ( s ) ± E.P.M. Os resultados foram analisados por ANOVA seguido por Student-Newman-Keuls como teste post hoc. ( <sup>a</sup>Salina vs Controle, p<0,05; <sup>b</sup> p <0,05 vs LPS ).

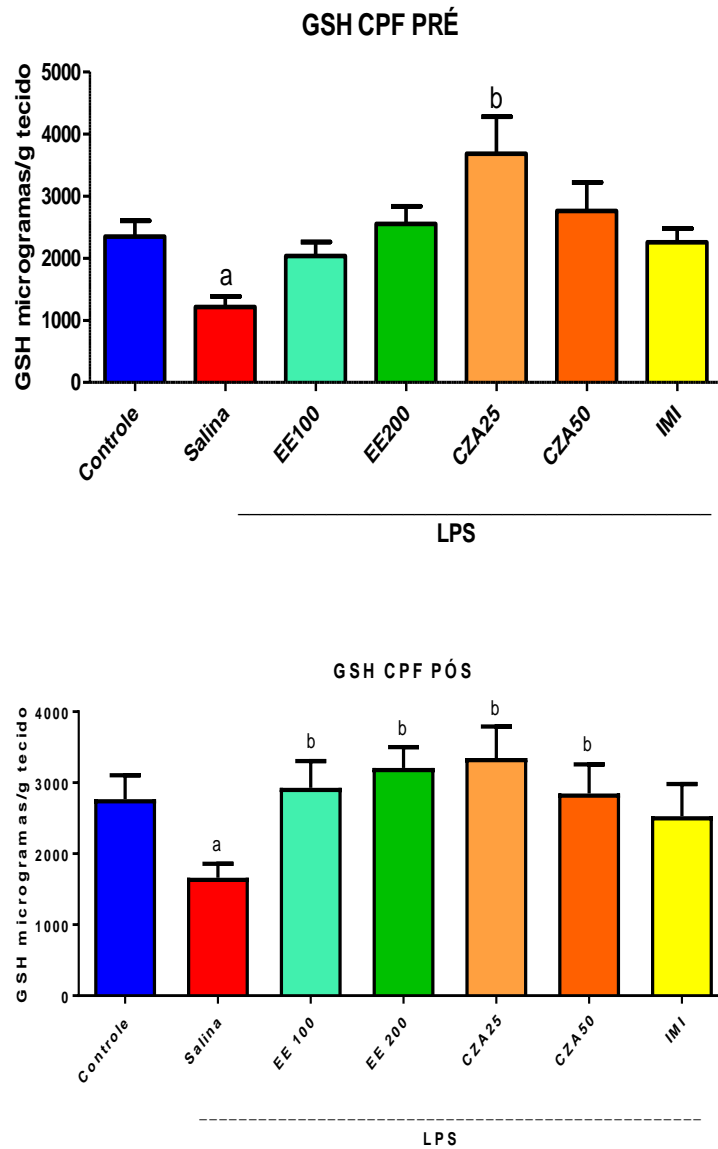
### 5.4.3 – Avaliação do estresse oxidativo e resposta inflamatória

#### 5.4.3.1 – Determinação dos níveis de glutathiona reduzida

##### 5.4.3.1.1 – Determinação dos níveis de glutathiona reduzida (GSH) do córtex pré-frontal no pré e pós tratamento com o extrato etanólico de *E. viscosa* e com o diterpeno CZA.

Apenas o diterpeno CZA na menor concentração testada (25 mg/kg) elevou os níveis de GSH no pré-tratamento em comparação com o grupo tratado apenas com LPS intraperitoneal (**Figura 24A**). Quanto ao pós-tratamento com o extrato e o diterpeno CZA, apenas a maior dose testada do extrato etanólico (200 mg/kg) e a menor dose do diterpeno CZA (25 mg /kg) apresentaram elevação na concentração de GSH no tecido cerebral do córtex pré-frontal, quando comparado ao tratamento apenas com LPS intraperitoneal (**Figura 24B**). [ Pré-tratamento: Controle:  $2349 \pm 254$  (7); Salina:  $1214 \pm 171$  (7); EE100:  $2034 \pm 226$  (7); EE200:  $2550 \pm 287$  (7); CZA25:  $3681 \pm 597$  (7); CZA50:  $2762 \pm 455$  (7). Pós-tratamento: Controle:  $2767 \pm 339$  (6); Salina:  $1663 \pm 195$  (6); EE100:  $2929 \pm 375$  (7) ; EE200:  $3207 \pm 294$  (7); CZA25:  $3348 \pm 444$  (7); CZA50:  $2848 \pm 411$  (7). Esses resultados foram semelhantes àqueles obtidos com a aplicação da droga imipramina (IMI, 10 mg/kg, ip). [Pré-tratamento: IMI:  $2258 \pm 217$  (7). Pós-tratamento: IMI:  $2529 \pm 451$  (7)].

**Figura 24:** Níveis de glutatona reduzida do córtex pré-frontal de camundongos pré-tratados (A) e pós-tratados(B) com o extrato etanólico (100 e 200 mg / kg, v.o.) e com o diterpeno furânico CZA (50 mg / kg, v.o) no teste do nado forçado, antes (pré) e após (pós) aplicação do Lipopolissacarídeo (LPS).

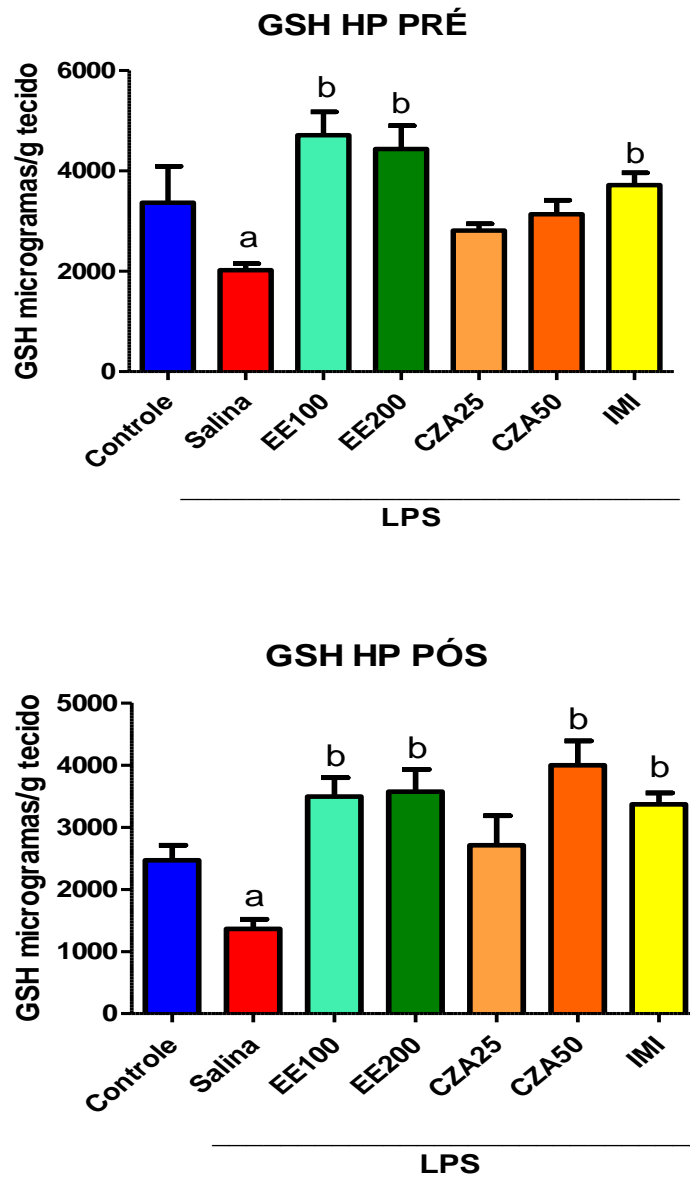


Teor de glutatona reduzida (GSH) no córtex pré-frontal de animais ( 7/grupo ) pré - tratados (antes da aplicação de LPS - A) e pós- tratados ( após a aplicação de LPS - B) com extrato etanólico (100 e 200 mg/kg), (CZA 25 e 50 mg/kg) e imipramina (IMI 10 mg/kg). Os valores numéricos representam a Média (s)  $\pm$  E.P.M. Os resultados foram analisados por ANOVA seguido por Student-Newman-Keuls como teste post hoc. ( <sup>a</sup>Salina vs Controle; <sup>b</sup> vs Salina,  $p < 0,05$ ).

#### 5.4.3.1.2 – Determinação dos níveis de glutathiona reduzida (GSH) do hipocampo no pré e pós tratamento com o extrato etanólico de *E. viscosa* e com o diterpeno CZA.

O extrato etanólico em ambas as concentrações testadas (100 e 200 mg/kg) elevou os níveis de GSH no pré-tratamento em comparação com o grupo tratado apenas com LPS intraperitoneal, o mesmo não ocorrendo com o diterpeno isolado dos extratos de *E. viscosa* (**Figura 25A**). O pós-tratamento revelou uma elevação do GSH no tecido cerebral do hipocampo com as drogas nas duas concentrações testadas, quando comparado ao tratamento apenas com LPS intraperitoneal (**Figura 25B**). [Pré-tratamento: Controle:  $2268 \pm 724.0$  (7); Salina:  $2025 \pm 130.1$  (7); EE100:  $4710 \pm 469.8$  (7); EE200:  $4438 \pm 465.4$  (7); CZA25:  $2813 \pm 134.2$  (7); CZA50:  $3138 \pm 280.3$  (7). Pós-tratamento: Controle:  $2467 \pm 245.5$  (7); Salina:  $1366 \pm 150.8$  (7); EE100:  $3493 \pm 305.3$  (7) ; EE200:  $3573 \pm 358.2$  (7); CZA25:  $2712 \pm 471.3$  (7); CZA50:  $3999 \pm 391.2$  (7). Esses resultados foram semelhantes àqueles obtidos com a aplicação da droga imipramina (IMI10, 10 mg/kg, ip). [Pré-tratamento: IMI:  $3718 \pm 242.4$  (7). Pós-tratamento: IMI:  $3370 \pm 180.9$  (7)].

**Figura 25:** Níveis de glutatona reduzida do hipocampo de camundongos pré-tratados (A) e pós-tratados(B) com o extrato etanólico (100 e 200 mg / kg, v.o.) e com o diterpeno furânico CZA (50 mg / kg, v.o) no teste do nado forçado, antes e após aplicação do Lipopolissacarídeo (LPS).



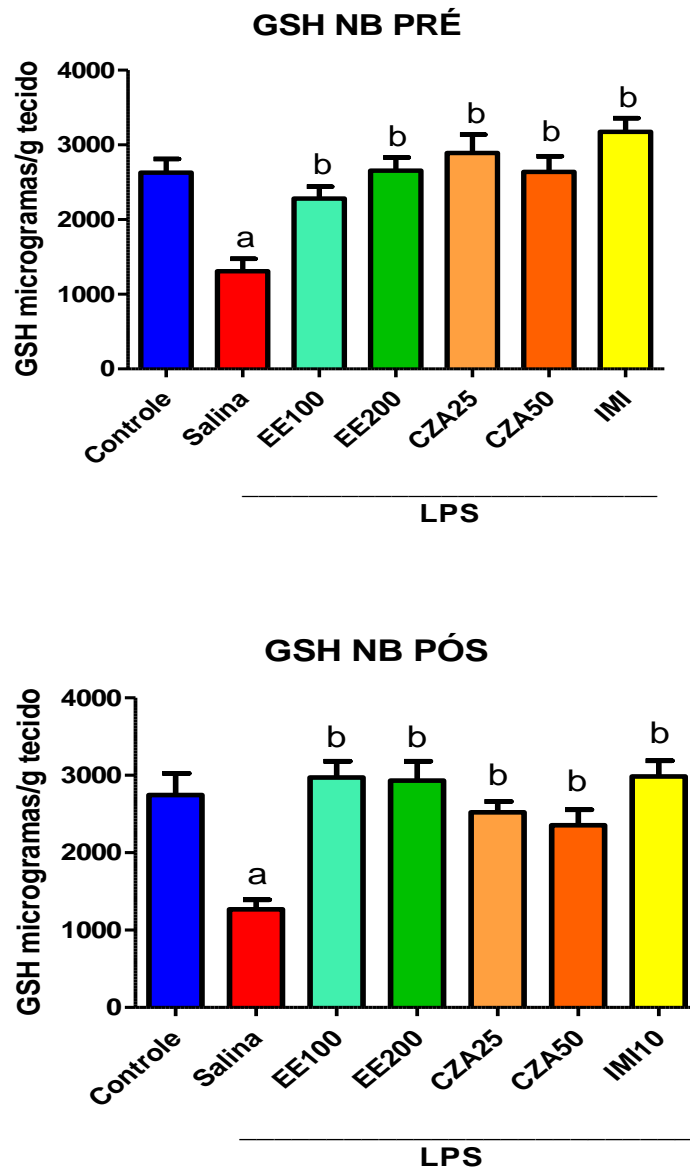
Teor de glutatona reduzida (GSH) no córtex hipocampo de animais ( 8/grupo ) pré - tratados ( A ) e pós- tratados ( B ) com extrato etanólico (100 e 200 mg/kg), (CZA 25 e 50 mg/kg) e imipramina (IMI 10 mg/kg) , antes e depois de LPS . ( <sup>a</sup>Salina vs Controle; <sup>b</sup> vs Salina,  $p < 0,05$ ), respectivamente .

#### 5.4.3.1.3 – Determinação dos níveis de glutathiona reduzida (GSH) nos núcleos da base no pré e pós tratamento com o extrato etanólico de *E. viscosa* e com o diterpeno CZA.

Os níveis de glutathiona reduzida nos núcleos da base de ambas as drogas testadas, nas duas concentrações (100 e 200 mg/kg no caso do extrato etanólico e 25 e 50 mg/kg no caso do diterpeno CZA) elevaram os valores desse marcador no caso do tratamento preventivo dos efeitos tipo-depressão gerados pela administração intraperitoneal com o LPS (**Figura 26A**). O mesmo ocorreu quando foi administrada a droga após aplicação de LPS intraperitoneal (pós-tratamento), onde ambas as drogas nas duas concentrações elevaram os níveis de glutathiona reduzida (**Figura 26B**). [ Pré-tratamento: Controle:  $2629 \pm 182.6$  (7); Salina:  $1309 \pm 165.7$  (7); EE100:  $2282 \pm 158.7$  (7); EE200:  $2654 \pm 177.9$  (7); CZA25:  $2892 \pm 246.6$  (7); CZA50:  $2637 \pm 211.1$  (7). Pós-tratamento: Controle:  $2746 \pm 280.4$  (7); Salina:  $1267 \pm 123.1$  (7); EE100:  $2971 \pm 212.6$  (7) ; EE200:  $2932 \pm 250.5$  (7); CZA25:  $2522 \pm 139.8$  (7); CZA50:  $2355 \pm 201.5$  (7). Esses resultados foram semelhantes àqueles obtidos com a aplicação da droga imipramina (IMI10, 10 mg/kg, ip). [Pré-tratamento: IMI:  $3174 \pm 183.1$  (7). Pós-tratamento: IMI:  $2986 \pm 201.0$  (7)].



**Figura 26:** Níveis de glutatona reduzida dos núcleos da base de camundongos pré-tratados (A) e pós-tratados(B) com o extrato etanólico (100 e 200 mg kg, v.o.) e com o diterpeno furânico CZA (50 mg kg, v.o) no teste do nado forçado, antes e após aplicação do Lipopolissacarídeo (LPS).

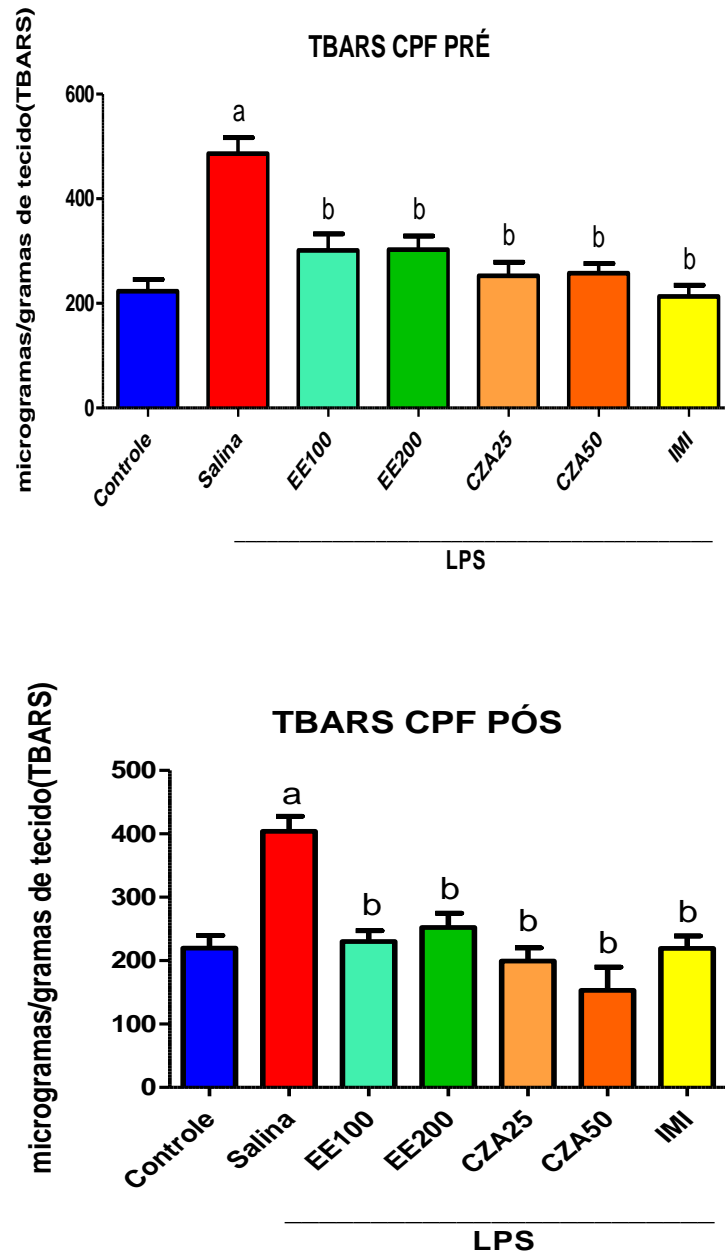


Teor de glutatona reduzida (GSH) nos núcleos da base de animais ( 8/grupo ) pré - tratados ( A ) e pós- tratados ( B ) com extrato etanólico (100 e 200 mg/kg), (CZA 25 e 50 mg/kg) e imipramina (IMI 10 mg/kg) , antes e depois de LPS . ( <sup>a</sup>Salina vs Controle; <sup>b</sup> vs Controle,  $p < 0,05$ ).

**5.4.3.2.1 – Determinação dos níveis de espécies reativas do ácido tiobarbitúrico(TBARS) do córtex pré-frontal de camundongos no pré e pós tratamento com o extrato etanólico de *E. viscosa* e com o diterpeno CZA.**

Os níveis de espécies reativas de ácido tiobarbitúrico (TBARS) do córtex pré-frontal de ambas as drogas , o extrato etanólico (EE) e o diterpeno clerodano CZA, nas duas concentrações (EE100, EE200, CZA25 e CZA50) reduziram os valores desse marcador no caso do tratamento preventivo dos efeitos tipo-depressão gerados pela administração intraperitoneal de LPS (**Figura 27A**). O mesmo ocorreu quando foi administrada a droga após aplicação de LPS intraperitoneal (pós-tratamento), onde ambas as drogas nas duas concentrações elevaram os níveis das espécies reativas de ácido tiobarbitúrico (TBARS) (**Figura 27B**). [ Pré-tratamento: CONTROLE:  $223.2 \pm 22.48$  (7); SALINA:  $486.0 \pm 30.51$  (7); EE100:  $301.4 \pm 31.47$  (7); EE200:  $303.0 \pm 35.73$  (7); CZA25:  $252.5 \pm 26.41$  (7); CZA50:  $257.7 \pm 18.54$  (7). Pós-tratamento: CONTROLE:  $219.9 \pm 31.54$  (7); SALINA:  $403.9 \pm 23.58$  (7); EE100:  $230.3 \pm 17.16$  (7) ; EE200:  $252.1 \pm 22.50$  (7); CZA25:  $199.2 \pm 21.01$  (7); CZA50:  $153.2 \pm 36.79$  (7). Esses resultados foram condizentes com aqueles obtidos com a aplicação da droga imipramina (IMI, 10 mg/kg, ip). [Pré-tratamento: IMI:  $213.3 \pm 21.30$  (7). Pós-tratamento: IMI:  $219.2 \pm 19.92$  (7)].

**Figura 27:** Níveis de espécies reativas do ácido tiobarbitúrico(TBARS) do córtex pré-frontal de camundongos pré-tratados (A) e pós-tratados(B) com o extrato etanólico (100 e 200 mg/kg, v.o.) e com o diterpeno furânico CZA (50 mg/kg, v.o) no teste do nado forçado, antes e após aplicação do Lipopolissacarídeo (LPS).

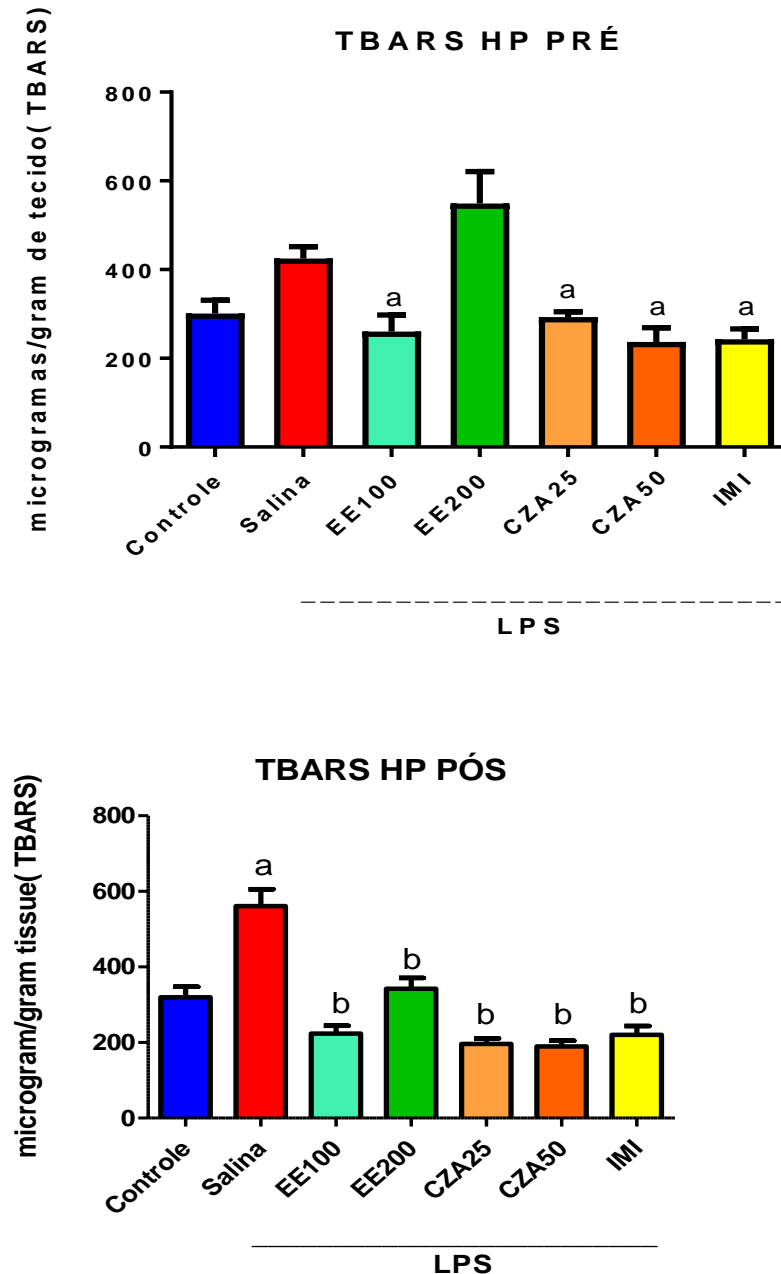


Níveis de espécies reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS) no córtex pré-frontal dos animais (6E10 / grupo) ( TBARS ) pré- tratados ( A ) e pós- tratado ( B ) com extrato etanólico (100 e 200 mg/kg), (CZA 25 e 50 mg/kg) e imipramina (IMI 10 mg/kg), antes e depois de LPS. ( <sup>a</sup>Salina vs Controle; <sup>b</sup> vs Salina,  $p < 0,05$  ).

**5.4.3.2.2 – Determinação dos níveis de espécies reativas do ácido tiobarbitúrico(TBARS) do hipocampo de camundongos no pré e pós tratamento com o extrato etanólico de *E. viscosa* e com o diterpeno CZA.**

Os níveis de TBARS do hipocampo no pré-tratamento foram reduzidos apenas quando foi aplicado o extrato etanólico na dose de 100 mg/kg (EE100), e quando a dose de 50 mg/kg do diterpeno furânico CZA (CZA50) foi aplicada, em comparação com o grupo tratado apenas com LPS intraperitoneal (**Figura 28A**). Quanto ao pós-tratamento com o extrato e o diterpeno CZA, todas as doses testadas apresentaram redução na concentração de TBARS do hipocampo, quando comparado ao tratamento apenas com LPS intraperitoneal (**Figura 28B**). [Pré-tratamento: Controle:  $301 \pm 30.04$  (7); Salina:  $425.2 \pm 26.79$  (7); EE100:  $260.3 \pm 37.30$  (7); EE200:  $548.9 \pm 72.14$  (7); CZA25:  $292.7 \pm 11.99$  (7); CZA50:  $237.1 \pm 31.68$  (7). Pós-tratamento: Controle:  $319.8 \pm 22.15$  (7); Salina:  $561 \pm 44.03$  (7); EE100:  $223.9 \pm 20.35$  (7) ; EE200:  $342.2 \pm 28.75$  (7); CZA25:  $196.6 \pm 14.70$  (7); CZA50:  $189.6 \pm 15.07$  (7). Esses resultados estão de acordo com aqueles obtidos na aplicação da droga imipramina (IMI, 10 mg/kg, ip). [Pré-tratamento: IMI:  $243.2 \pm 23.41$  (7). Pós-tratamento: IMI:  $220.2 \pm 23.29$  (7)].

**Figura 28:** Níveis de espécies reativas do ácido tiobarbitúrico(TBARS) do hipocampo de camundongos pré-tratados (A) e pós-tratados(B) com o extrato etanólico (100 e 200 mg/kg, v.o.) e com o diterpeno furânico CZA (50 mg/kg, v.o) no teste do nado forçado, antes e após aplicação do Lipopolissacarídeo (LPS).

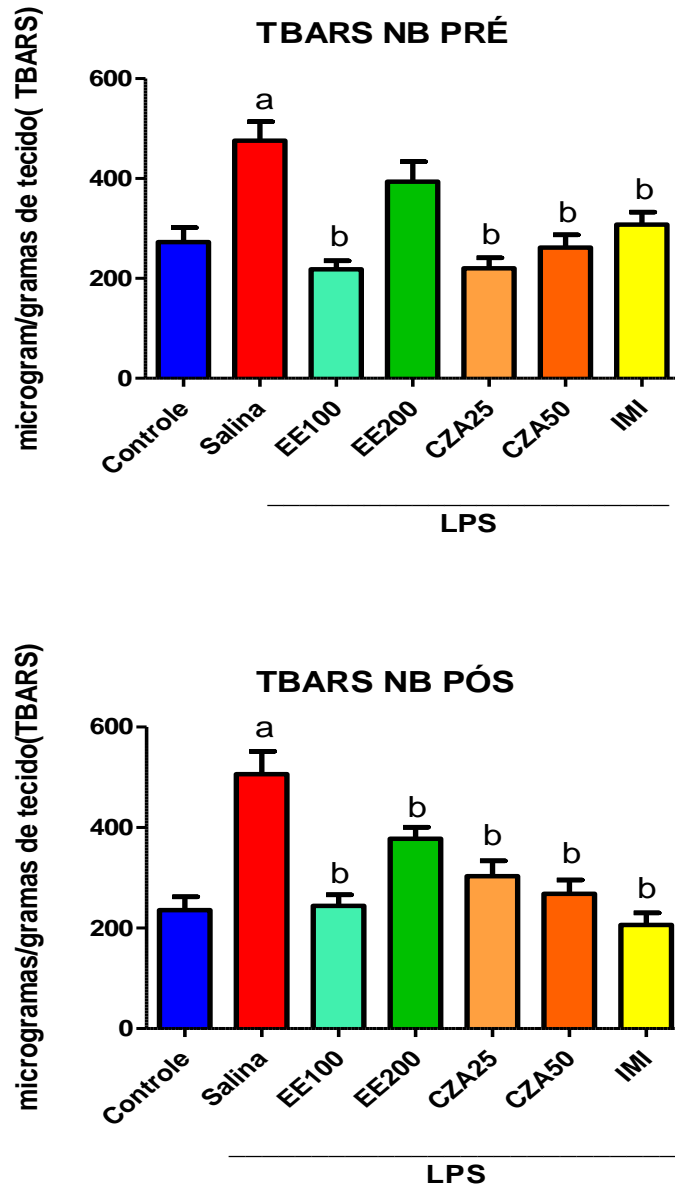


Níveis de espécies reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS) no córtex hipocampo dos animais ( 8 / grupo) ( TBARS ) pré- tratados (A) e pós- tratado ( B) com extrato etanólico (100 e 200 mg/kg), (CZA 25 e 50 mg/kg) e imipramina (IMI 10 mg/kg), antes e depois de LPS . ( <sup>a</sup>Salina vs Controle; <sup>b</sup> vs Salina,  $p < 0,05$ ).

**5.4.3.2.3 – Determinação dos níveis de espécies reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS) nos núcleos da base de camundongos no pré e pós tratamento com o extrato etanólico de *E. viscosa* e com o diterpeno CZA.**

Os níveis de TBARS dos núcleos da base no pré-tratamento foram reduzidos apenas quando foi aplicado o extrato etanólico na dose 100 mg/kg (EE100), e quando as duas doses do diterpeno furânico CZA, de 25 e 50 mg/kg (CZA25 e CZA50) foram aplicadas, em comparação com o grupo tratado apenas com LPS intraperitoneal (**Figura 29A**). Quanto ao pós-tratamento com o extrato e o diterpeno CZA, todas as doses testadas apresentaram redução na concentração de TBARS do hipocampo, quando comparado ao tratamento apenas com LPS intraperitoneal (**Figura 29B**). [ Pré-tratamento: Controle:  $273.0 \pm 28.66$  (7); Salina:  $475.8 \pm 28.13$  (7); EE100:  $218.1 \pm 17.10$  (7); EE200:  $393.5 \pm 40.14$  (7); CZA25:  $220.4 \pm 20.88$  (7); CZA50:  $261.7 \pm 25.82$  (7). Pós-tratamento: Controle:  $319.8 \pm 22.15$  (7); Salina:  $561 \pm 44.03$  (7); EE100:  $223.9 \pm 20.35$  (7) ; EE200:  $342.2 \pm 28.75$  (7); CZA25:  $196.6 \pm 14.70$  (7); CZA50:  $189.6 \pm 15.07$  (7). Esses resultados estão de acordo com aqueles obtidos na aplicação da droga imipramina (IMI10, 10 mg/kg, ip). [Pré-tratamento: IMI:  $243.2 \pm 23.41$  (7). Pós-tratamento: IMI:  $220.2 \pm 23.29$  (7)].

**Figura 29:** Níveis de espécies reativas do ácido tiobarbitúrico(TBARS) do núcleo da base de camundongos pré-tratados (A) e pós-tratados(B) com o extrato etanólico (100 e 200 mg/kg, v.o.) e com o diterpeno furânico CZA (50 mg/kg, v.o) no teste do nado forçado, antes e após aplicação do Lipopolissacarídeo (LPS).



Níveis de espécies reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS) nos núcleos da base dos animais ( 8/grupo) ( TBARS ) pré- tratados (A) e pós- tratado ( B) com extrato etanólico (100 e 200 mg/kg), (CZA 25 e 50 mg/kg) e imipramina (IMI 10 mg/kg), antes e depois de LPS. ( <sup>a</sup>Salina vs Controle; <sup>b</sup> vs Salina,  $p < 0,05$ ).

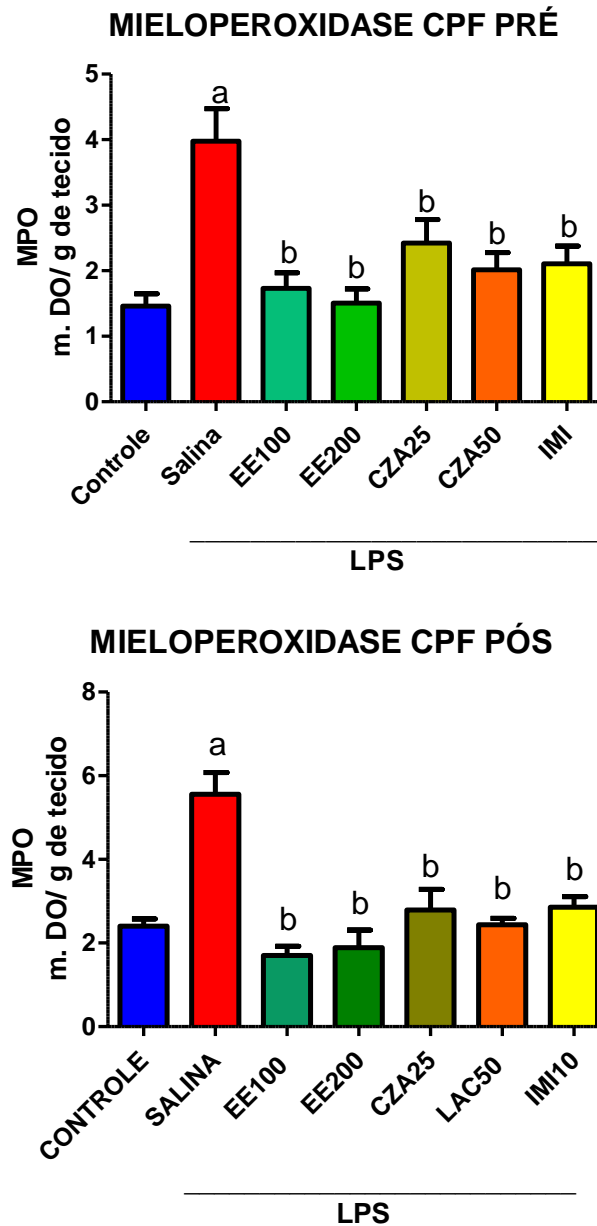
### 5.4.3.3 – Determinação dos níveis de Mieloperoxidase

#### 5.4.3.3.1 – Determinação dos níveis da enzima mieloperoxidase (MPO) no córtex pré-frontal de camundongos no pré e pós tratamento com o extrato etanólico de *E. viscosa* e com o diterpeno CZA.

Podemos observar que os níveis de mieloperoxidase (MPO) do córtex pré-frontal de ambas as drogas testadas, nas duas concentrações (100 e 200 mg/kg no caso do extrato etanólico e 25 e 50 mg/kg no caso do diterpeno CZA) reduziram os valores desse marcador no caso do tratamento preventivo dos efeitos tipo-depressão gerados pela administração intraperitoneal com o LPS (**Figura 30A**). O mesmo ocorreu quando foi administrada a droga após aplicação de LPS intraperitoneal (pós-tratamento), onde ambas as drogas nas duas concentrações reduziram os níveis da concentração de MPO (**Figura 30B**). [Pré-tratamento: Controle:  $1.460 \pm 0.186$  (7); Salina:  $3.977 \pm 0.497$  (7); EE100:  $1.732 \pm 0.235$  (8); EE200:  $1.506 \pm 0.217$  (8); CZA25:  $2.423 \pm 0.358$  (8); CZA50:  $2.016 \pm 0.259$  (8). Pós-tratamento: Controle:  $2.406 \pm 0.173$  (7); Salina;  $5.560 \pm 0.518$  (7); EE100:  $1.706 \pm 0.217$  (8) ; EE200:  $1.889 \pm 0.422$  (8); CZA25:  $2.788 \pm 0.493$  (8); CZA50:  $2.439 \pm 0.154$  (8). Esses resultados foram condizentes com aqueles obtidos com a aplicação da droga imipramina (IMI, 10 mg/kg, ip). [Pré-tratamento: IMI:  $2.105 \pm 0.272$  (7). Pós-tratamento: IMI:  $2.853 \pm 0.254$  (7)].



**Figura 30:** Níveis de mieloperoxidase (MPO) do córtex pré-frontal de camundongos pré-tratados (A) e pós-tratados(B) com o extrato etanólico (100 e 200 mg / kg, v.o.) e com o diterpeno furânico CZA (50 mg / kg, v.o) no teste do nado forçado, antes e após aplicação do Lipopolissacarídeo (LPS).



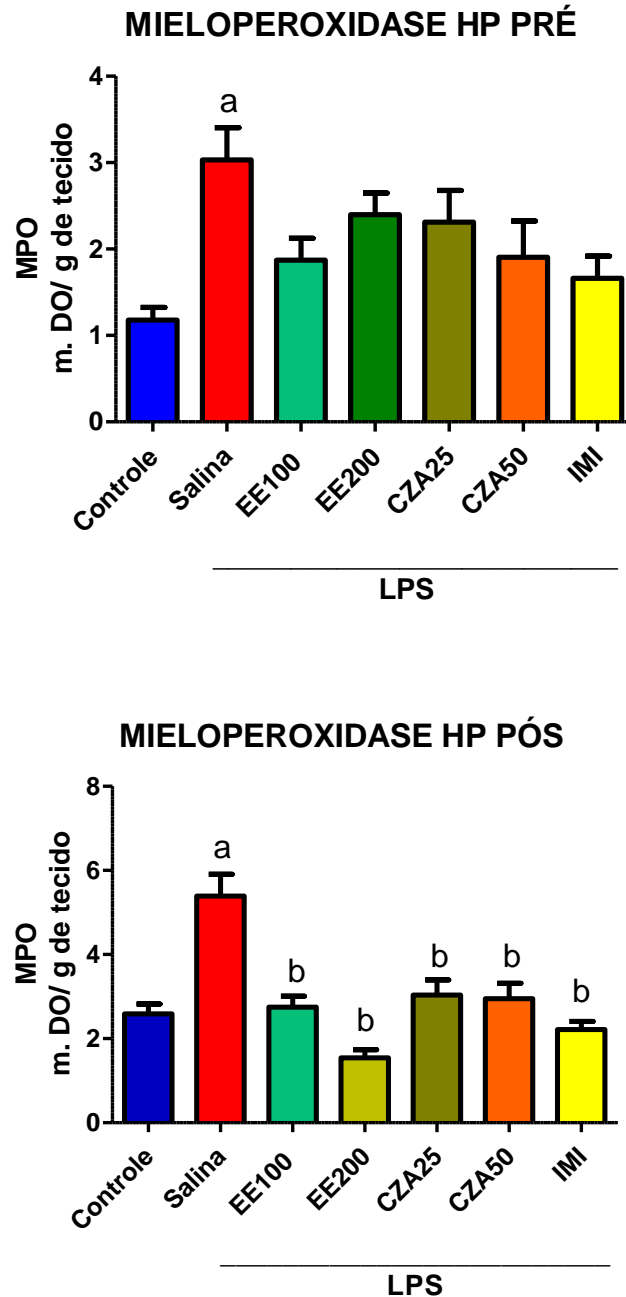
Níveis de mieloperoxidase tecidual ( MPO ) no córtex pré-frontal dos animais ( 8 / grupo) ( MPO ) pré- tratados (A) e pós- tratado ( B) com extrato etanólico (100 e 200 mg/kg), (CZA 25 e 50 mg/kg) e imipramina (IMI 10 mg/kg), antes e depois de LPS. ( <sup>a</sup>Salina vs Controle; <sup>b</sup> vs Salina,  $p < 0,05$ ).

#### 5.4.4.3.2 – Determinação dos níveis da enzima mieloperoxidase (MPO) no hipocampo de camundongos no pré e pós tratamento com o extrato etanólico de *E. viscosa* e com o diterpeno CZA.

Podemos observar que os níveis de mieloperoxidase (MPO) do hipocampo de ambas as drogas testadas, nas duas concentrações (100 e 200 mg/kg no caso do extrato etanólico e 25 e 50 mg/kg no caso do diterpeno CZA) foram incapazes de reduzir os valores desse marcador no caso do tratamento preventivo dos efeitos tipo-depressão gerados pela administração intraperitoneal com o LPS. Os dados foram significativos para redução da mieloperoxidase tecidual quando foi administrada a droga após aplicação de LPS intraperitoneal (pós-tratamento), onde as duas drogas conseguiram reduzir os níveis da concentração de MPO (**Figuras 31 A e B**).

[ Pré-tratamento: Controle:  $1.180 \pm 0.145$  (7); Salina:  $3.031 \pm 0.373$  (7); EE100:  $1.871 \pm 0.252$  (8); EE200:  $2.398 \pm 0.250$  (8); CZA25:  $2.312 \pm 0.367$  (8); CZA50:  $1.906 \pm 0.420$  (8). Pós-tratamento: Controle:  $2.589 \pm 0.234$  (7); Salina:  $5.392 \pm 0.520$  (7); EE100:  $2.752 \pm 0.255$  (8) ; EE200:  $1.541 \pm 0.196$  (8); CZA25:  $3.036 \pm 0.362$  (8); CZA50:  $2.953 \pm 0.362$  (8). Esses resultados foram condizentes com aqueles obtidos com a aplicação da droga imipramina (IMI, 10 mg/kg, ip). [Pré-tratamento: IMI:  $1.663 \pm 0.256$  (7). Pós-tratamento: IMI:  $2.214 \pm 0.197$  (7)].

**Figura 31:** Níveis de mieloperoxidase do hipocampo de camundongos pré-tratados (A) e pós-tratados(B) com o extrato etanólico (100 e 200 mg / kg, v.o.) e com o diterpeno furânico CZA (50 mg / kg, v.o) no teste do nado forçado, antes e após aplicação do Lipopolissacarídeo (LPS).

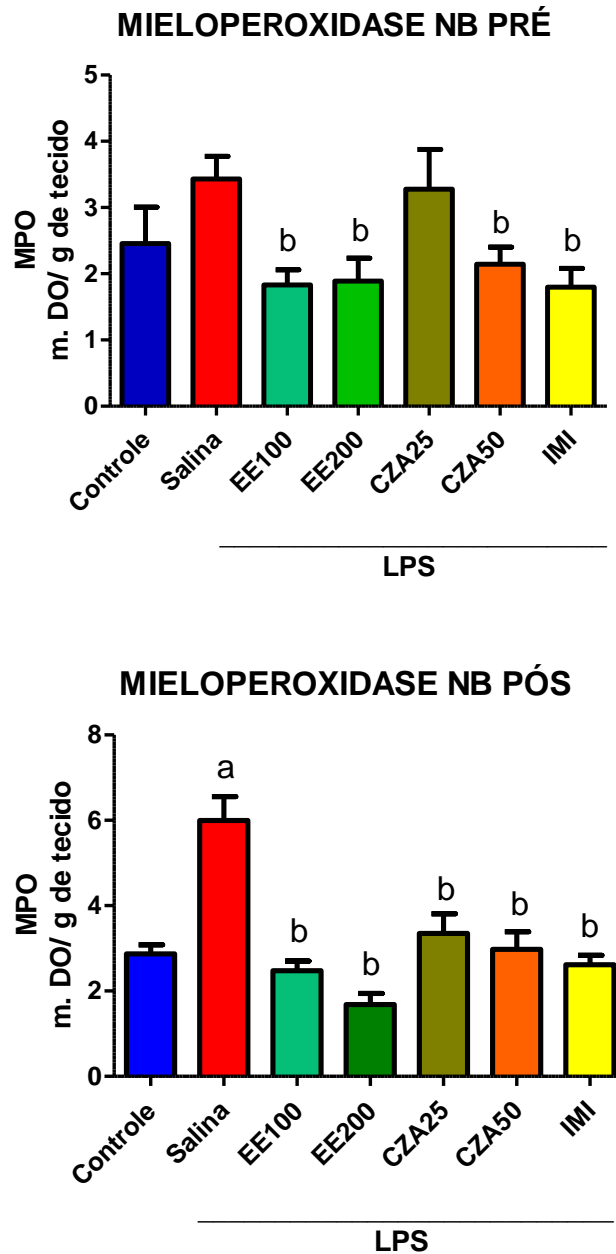


Níveis de mieloperoxidase tecidual ( MPO ) no hipocampo dos animais ( 8 / grupo) ( MPO ) pré-tratados (A) e pós- tratado ( B) com extrato etanólico (100 e 200 mg/kg), (CZA 25 e 50 mg/kg) e imipramina (IMI mg/kg), antes e depois de LPS. ( <sup>a</sup>Salina vs Controle; <sup>b</sup> vs Salina,  $p < 0,05$ ).

#### **5.4.4.3.3 – Determinação dos níveis da enzima mieloperoxidase (MPO) nos núcleos da base de camundongos no pré e pós tratamento com o extrato etanólico de *E. viscosa* e com o diterpeno CZA.**

De forma semelhante aos dados obtidos na análise do hipocampo, os níveis de mieloperoxidase (MPO) dos núcleos da base de ambas as drogas testadas, nas duas concentrações (100 e 200 mg/kg no caso do extrato etanólico e 25 e 50 mg/kg no caso do diterpeno CZA) foram incapazes de reduzir os valores desse marcador no caso do tratamento preventivo dos efeitos tipo-depressão gerados pela administração intraperitoneal com o LPS (**Figura 32A**). No pós-tratamento essa redução dos níveis da MPO foram significativos, onde foi possível observar ambas as drogas conseguindo diminuir os níveis da concentração de MPO (**Figura 32B**). [Pré-tratamento: Controle:  $2.450 \pm 0.550$  (7); Salina:  $3.430 \pm 0.343$  (7); EE100:  $1.833 \pm 0.227$  (8); EE200:  $1.891 \pm 0.344$  (8); CZA25:  $3.276 \pm 0.602$  (8); CZA50:  $2.144 \pm 0.259$  (8). Pós-tratamento: Controle:  $2.867 \pm 0.213$  (7); Salina:  $5.994 \pm 0.565$  (7); EE100:  $2.476 \pm 0.221$  (8); EE200:  $1.681 \pm 0.262$  (8); CZA25:  $3.350 \pm 0.459$  (8); CZA50:  $2.976 \pm 0.412$  (8). Esses resultados foram condizentes com aqueles obtidos com a aplicação da droga imipramina (IMI, 10 mg/kg, ip). [Pré-tratamento: IMI:  $1.796 \pm 0.283$  (7). Pós-tratamento: IMI:  $2.619 \pm 0.215$  (7)].

**Figura 32:** Níveis de mieloperoxidase dos núcleos da base de camundongos pré-tratados (A) e pós-tratados(B) com o extrato etanólico (100 e 200 mg / kg, v.o.) e com o diterpeno furânico CZA (50 mg / kg, v.o) no teste do nado forçado, antes e após aplicação do Lipopolissacarídeo (LPS).



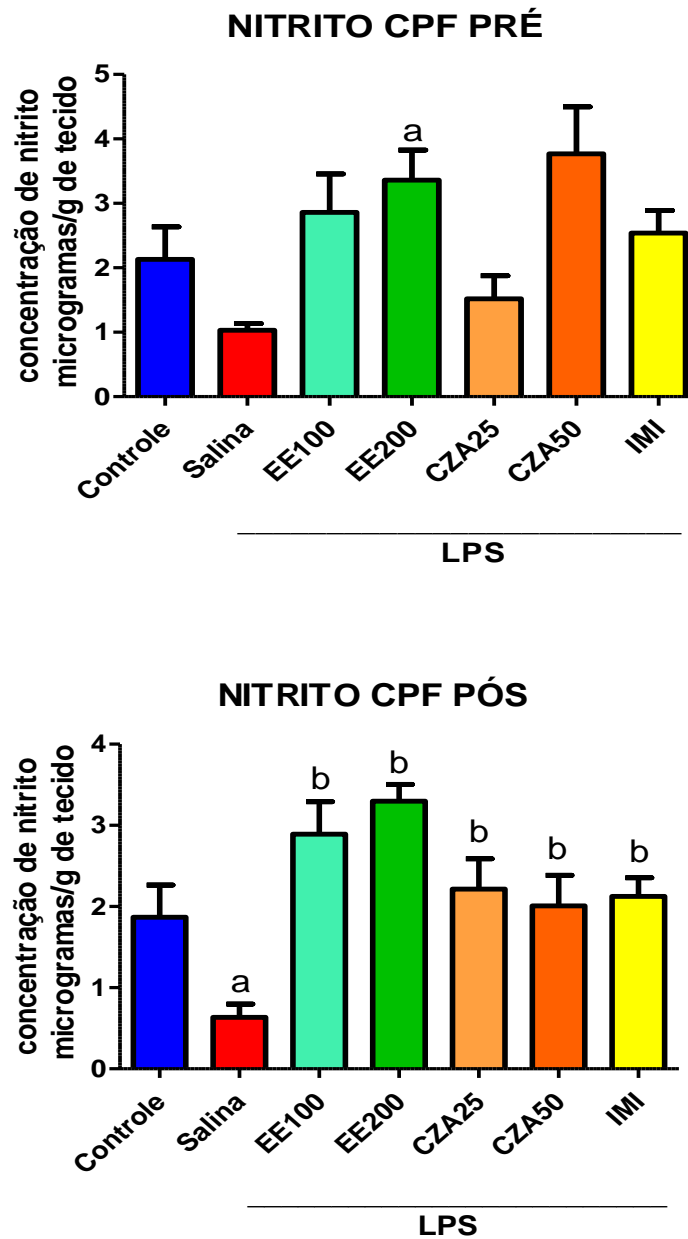
Níveis de mieloperoxidase tecidual ( MPO ) nos núcleos da base dos animais ( 8 / grupo) ( MPO ) pré- tratados (A) e pós- tratado ( B) com extrato etanólico (100 e 200 mg/kg), (CZA 25 e 50 mg/kg) e imipramina (IMI 10 mg/kg), antes e depois de LPS. ( <sup>a</sup>Salina vs Controle; <sup>b</sup> vs Salina,  $p < 0,05$ ).

#### 5.4.3.4 Determinação dos níveis de nitrito

##### 5.4.3.4.1 – Determinação dos níveis de nitrito do córtex pré-frontal no pré e pós tratamento com o extrato etanólico de *E. viscosa* e com o diterpeno CZA.

Os níveis de nitrito (**Figura 33A**) do córtex pré-frontal no pré-tratamento foram elevados apenas quando foi aplicado o extrato etanólico na dose 200 mg/kg (EE200) em comparação com o grupo tratado apenas com LPS intraperitoneal. Quanto ao pós-tratamento com o extrato e o diterpeno CZA, todas as doses testadas apresentaram elevação na concentração de nitrito no tecido cerebral do córtex pré-frontal, quando comparado ao tratamento apenas com LPS intraperitoneal (**Figura 33B**). [pré-tratamento: Controle:  $2.13 \pm 0.50$  (7); Salina:  $1.03 \pm 0.10$  (7); EE100:  $2.86 \pm 0.59$  (7); EE200:  $3.36 \pm 0.46$  (7); CZA25:  $1.52 \pm 0.36$  (7); CZA50:  $3.76 \pm 0.72$  (7). Pós-tratamento: Controle:  $1.87 \pm 0.39$  (6); Salina:  $0.63 \pm 0.16$  (6); EE100:  $2.89 \pm 0.40$  (7) ; EE200:  $3.29 \pm 0.21$  (7); CZA25:  $2.21 \pm 0.38$  (7); CZA50:  $2.01 \pm 0.38$  (7). Esses resultados foram semelhantes àqueles obtidos com a aplicação da droga imipramina (IMI, 10 mg/kg, ip). [Pré-tratamento: IMI:  $2.54 \pm 0.35$  (7). Pós-tratamento: IMI:  $2.12 \pm 0.23$  (7)].

**Figura 33:** Níveis de nitrito do córtex pré-frontal de camundongos pré-tratados (A) e pós-tratados(B) com o extrato etanólico (100 e 200 mg/kg, v.o.) e com o diterpeno furânico CZA (50 mg / kg, v.o) no teste do nado forçado, antes e após aplicação do Lipopolissacarídeo (LPS).



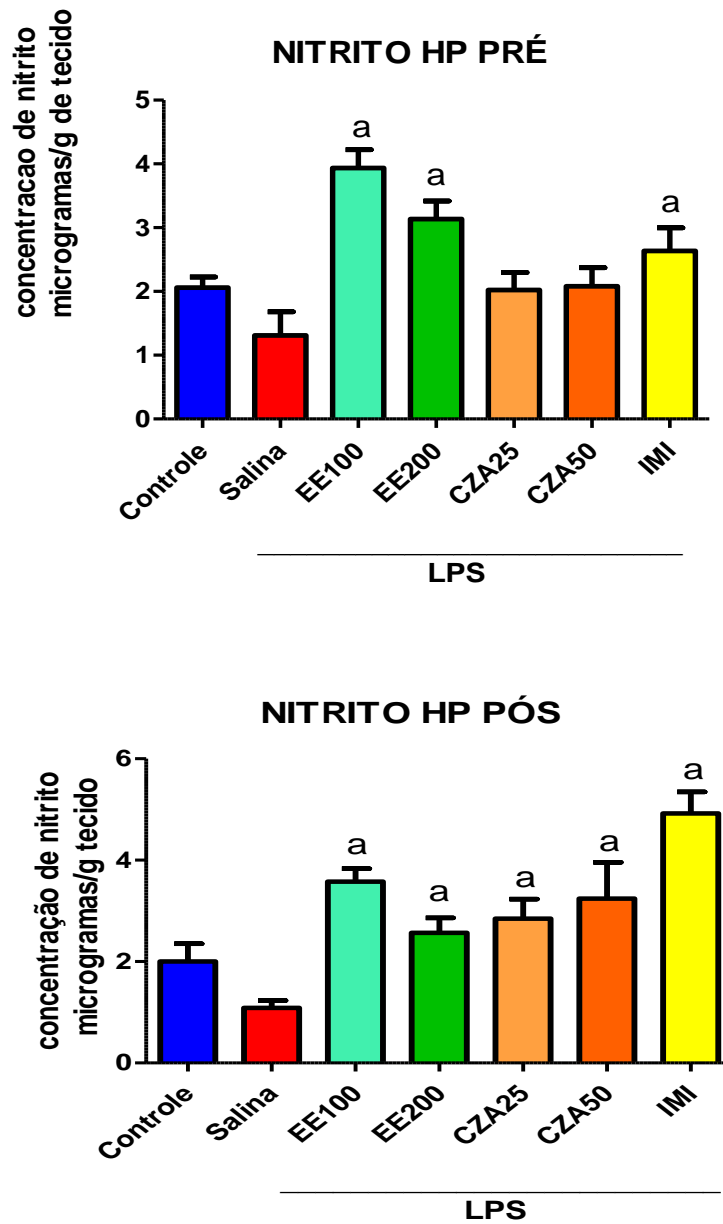
Determinação dos níveis de nitrito no córtex pré-frontal de animais (7/grupo) pré - tratados ( A) e de pós- tratados (B) com extrato etanólico (100 e 200 mg/kg), (CZA 25 e 50 mg/kg) e imipramina (IMI 10 mg/kg) , antes e depois de LPS . Os valores numéricos representam a Média (s)  $\pm$  E.P.M. Os resultados foram analisados por ANOVA seguido por Student-Newman-Keuls como teste post hoc. ( <sup>a</sup>Salina vs Controle; <sup>b</sup> vs Salina,  $p < 0,05$ ).

#### 5.4.3.4.2 – Determinação dos níveis de nitrito do hipocampo no pré e pós tratamento com o extrato etanólico de *E. viscosa* e com o diterpeno CZA.

Os níveis de nitrito (**Figura 34A**) do hipocampo no pré-tratamento foram elevados apenas quando foi aplicado o extrato etanólico em ambas as doses de 100 e 200 mg/kg (EE100 e EE200) em comparação com o grupo tratado apenas com LPS intraperitoneal. Quanto ao pós-tratamento com o extrato e o diterpeno CZA, todas as doses testadas apresentaram elevação na concentração de nitrito no tecido cerebral do hipocampo, quando comparado ao tratamento apenas com LPS intraperitoneal (**Figura 34B**). [ Pré-tratamento: Controle:  $2.05 \pm 0.17$  (7); Salina:  $1.31 \pm 0.37$  (7); EE100:  $3.94 \pm 0.29$  (7); EE200:  $3.13 \pm 0.28$  (7); CZA25:  $2.01 \pm 0.27$  (7); CZA50:  $2.08 \pm 0.29$  (7). Pós-tratamento: Controle:  $2.00 \pm 0.35$  (7); Salina:  $1.09 \pm 0.14$  (7); EE100:  $3.58 \pm 0.26$  (7) ; EE200:  $2.57 \pm 0.30$  (7); CZA25:  $2.85 \pm 0.38$  (7); CZA50:  $3.24 \pm 0.71$  (7). Esses resultados foram semelhantes àqueles obtidos com a aplicação da droga imipramina (IMI, 10 mg/kg, ip). [Pré-tratamento: IMI:  $2.63 \pm 0.36$  (7). Pós-tratamento: IMI:  $4.92 \pm 0.42$  (7)].



**Figura 34:** Níveis de nitrito do hipocampo de camundongos pré-tratados (A) e pós-tratados(B) com o extrato etanólico (100 e 200 mg / kg, v.o.) e com o diterpeno furânico CZA (50 mg / kg, v.o) no teste do nado forçado, antes e após aplicação do Lipopolissacarídeo (LPS).

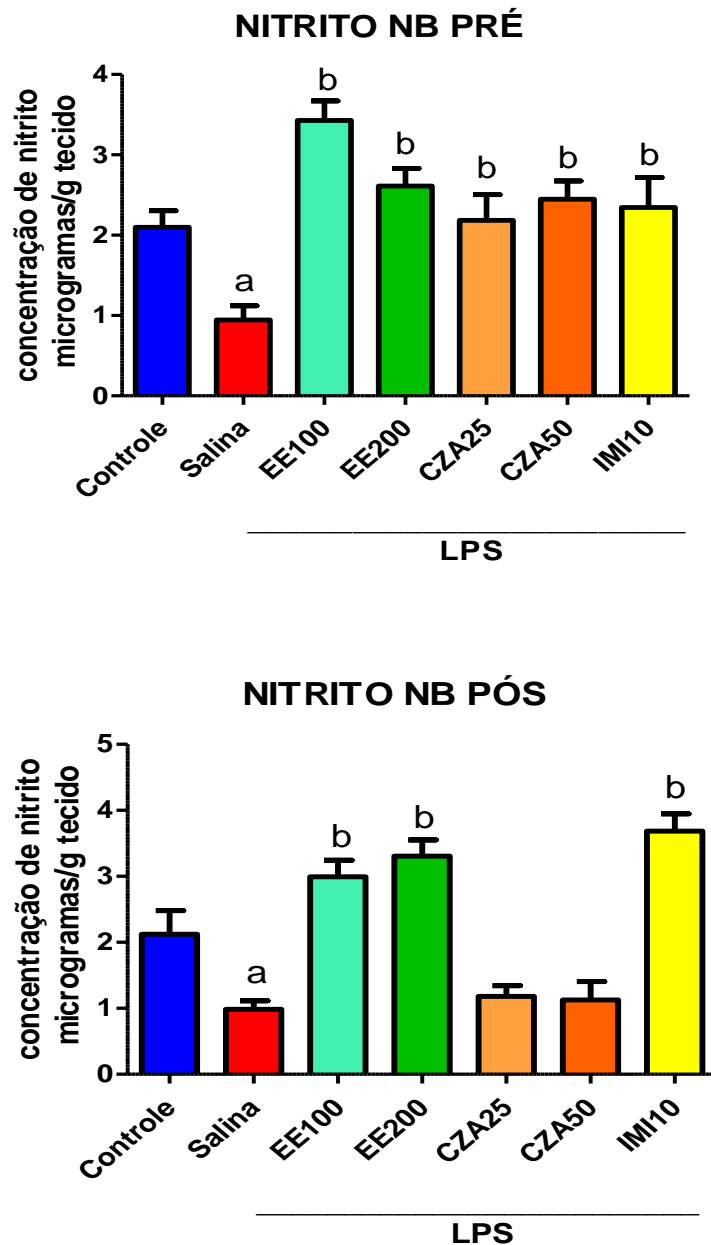


Determinação dos níveis de nitrito no hipocampo de animais ( 7 / grupo ) pré - tratados ( A) e de pós- tratados (B) com extrato etanólico (100 e 200 mg/kg), (CZA 25 e 50 mg/kg) e imipramina (IMI 10 mg/kg) , antes e depois de LPS . Os valores numéricos representam a Média (s) ± E.P.M. Os resultados foram analisados por ANOVA seguido por Student-Newman-Keuls como teste post hoc. ( <sup>b</sup> vs Salina,  $p < 0,05$ ).

#### 5.4.3.4.3 – Determinação dos níveis de nitrito dos núcleos da base no pré e pós tratamento com o extrato etanólico de *E. viscosa* e com o diterpeno CZA.

Tanto o extrato quando o diterpeno CZA em todas as concentrações testadas elevaram os níveis de nitrito no pré-tratamento em comparação com o grupo tratado apenas com LPS intraperitoneal (**Figura 35A**). Quanto ao pós-tratamento com o extrato e o diterpeno CZA, apenas as doses testadas do extrato etanólico (EE100 e EE200) apresentaram elevação na concentração de nitrito no tecido cerebral dos núcleos da base, quando comparado ao tratamento apenas com LPS intraperitoneal (**Figura 35B**). [ Pré-tratamento: Controle:  $2.10 \pm 0.21$  (7); Salina:  $0.95 \pm 0.18$  (7); EE100:  $3.94 \pm 0.29$  (7); EE200:  $3.43 \pm 0.24$  (7); CZA25:  $2.18 \pm 0.32$  (7); CZA50:  $2.45 \pm 0.23$  (7). Pós-tratamento: Controle:  $2.12 \pm 0.36$  (6); Salina:  $0.99 \pm 0.13$  (6); EE100:  $2.99 \pm 0.26$  (7) ; EE200:  $3.30 \pm 0.25$  (7); CZA25:  $1.18 \pm 0.26$  (7); CZA50:  $1.13 \pm 0.26$  (7). Esses resultados foram semelhantes àqueles obtidos com a aplicação da droga imipramina (IMI, 10 mg/kg, ip). [Pré-tratamento: IMI:  $2.34 \pm 0.37$  (7). Pós-tratamento: IMI:  $3.68 \pm 0.26$  (7)].

**Figura 35:** Níveis de nitrito do núcleo da base de camundongos pré-tratados (A) e pós-tratados (B) com o extrato etanólico (100 e 200 mg / kg, v.o.) e com o diterpeno furânico CZA (50 mg / kg, v.o) no teste do nado forçado, antes e após aplicação do Lipopolissacarídeo (LPS).



Determinação dos níveis de nitrito no núcleo da base de animais ( 7 / grupo ) pré - tratados ( A ) e de pós- tratados ( B ) com extrato etanólico (100 e 200 mg/kg), (CZA 25 e 50 mg/kg) e imipramina (IMI 10 mg/kg) , antes e depois de LPS . Os valores numéricos representam a Média (s)  $\pm$  E.P.M. Os resultados foram analisados por ANOVA seguido por Student-Newman-Keuls como teste post hoc. ( <sup>a</sup>Salina vs Controle; <sup>b</sup> vs Salina,  $p < 0,05$ ).

***DISCUSSÃO***

---

## 6 DISCUSSÃO

No presente trabalho foi realizada uma triagem inicial com o teste do campo aberto, sendo esse considerado robusto para a obtenção de um panorama preliminar da influência da droga na excitabilidade do sistema nervoso central, visando reduzir a probabilidade de resultados falso-positivos em testes posteriores (MANSUR; MARTZ; CARLINI, 1971).

Sabe-se, por exemplo, que a diminuição da atividade locomotora exploratória (ALE) pode estar relacionada à sedação resultante da depressão do SNC (OZTURK *et al.*, 1996), enquanto que o aumento desse parâmetro pode estar associado a um efeito psicoestimulante. Substâncias psicoestimulantes, tais como a anfetamina e a cafeína, promovem aumento da ALE em animais e humanos gerando resultados falso-positivos em testes para avaliação de atividades ansiolítica e antidepressiva (PELLOW *et al.*, 1985).

Diante do exposto, pode-se enfatizar que os efeitos observados após a administração das drogas derivadas de *E.viscosa* nos testes comportamentais de ansiedade e depressão não são resultado de interferência sobre a atividade locomotora, visto que a administração da substância teste não alterou a ALE dos animais no teste do campo aberto. Em contraste, o diazepam na dose de 1 mg/kg diminuiu a ALE no teste do campo aberto mostrando seu potencial efeito sedativo nesta dose. Vale ainda ressaltar que os efeitos ansiolíticos e antidepressivos do extrato e do diterpeno CZA não são acompanhados de um efeito sedativo no campo aberto, sendo este um efeito colateral indesejado na maioria dos tratamentos contra a ansiedade.

Além da ALE, o *rearing* e o *grooming* também foram observados no teste do campo aberto. A atividade de *rearing* em roedores é descrita como um comportamento estereotipado complexo (DANDIYA *et al.*, 1969), sendo um parâmetro de interpretação variável na literatura. Alguns autores descrevem que o *rearing* reflete um comportamento exploratório do animal (JOHANSSON; AHLENIUS, 1989) e portanto, a administração de substâncias ansiolíticas poderiam induzir um aumento da atividade de *rearing* ou não alterá-la. Por outro lado, alguns autores relacionam tal parâmetro com os níveis de excitabilidade do SNC e sugerem que a administração de agentes ansiolíticos e sedativos diminuem o *rearing* (MANSUR; MARTZ; CARLINI, 1971).

Neste trabalho, a administração do extrato (EE 100 e 200 mg/kg) bem como do diterpeno furânico (CZA 25 e 50 mg/kg) nas doses e vias testadas não reduziu o número de *rearing*. Enquanto que a administração de diazepam na dose de 1 mg/kg reduziu esse parâmetro, demonstrando que em uma dose sedativa este parâmetro é significativamente diminuído. Desse modo, nossos resultados nos fazem sugerir que o efeito induzido pelas drogas derivadas de *E. viscosa* no LCE não são sedativos o suficiente para alterar o comportamento de *rearing* no campo aberto.

Com relação ao *grooming*, a literatura refere que o aumento deste comportamento pode ser observado em roedores apreensivos (ARCHER, 1973), e em um grande número de estudos, pesquisadores observaram que a administração de drogas ansiolíticas reduzem este parâmetro no teste do campo aberto (BARROS; TANNHAUSER; TANNHAUSER, 1994). Em nosso estudo, houve uma redução significativa do número de *grooming* induzida pela administração do extrato etanólico nas duas doses, sendo que essa redução também ocorreu quando foi administrado o diterpeno CZA na dose de 50 mg/kg sugerindo a atividade ansiolítica dos mesmos.

Foram adotadas algumas medidas durante a execução do teste do campo aberto, teste que tem como premissa a aversão de roedores à ambientes desconhecidos e desprotegidos, visando a redução do viés (TREIT; MENARD; ROYAN, 1989). Tendo em vista que nos experimentos onde há uma área definida, como no campo aberto, os roedores tipicamente começam a explorar a região próxima às paredes, evitando a parte aberta, iniciou-se o teste colocando o animal no centro da área. O nível de iluminação do ambiente também é outro ponto causador de estresse, sendo as áreas mais claras locais mais aversivos aos animais do que as escuras. Visando contornar esse fator, colocou-se os animais em uma sala fechada com uma fraca iluminação por luz vermelha de 15W.

Outro teste realizado com o intuito de avaliar um possível déficit na coordenação motora causado pelas drogas derivadas da *E. viscosa* foi o teste da barra giratória, também conhecido como *rota rod*. Este teste proposto por Dunham e Miya, (1957) avalia o potencial efeito de relaxamento muscular ou incoordenação motora de substâncias (CARLINI; BURGOS, 1979). Quanto mais intenso for o efeito relaxante muscular menos tempo o animal conseguirá se equilibrar sobre a barra giratória. Ressalta-se, no entanto, que se trata de um método não-específico, uma vez que mede indistintamente, efeitos neurológicos, estimulantes e depressores

sobre a coordenação motora, aos quais também é atribuído o termo neurotoxicidade (DALLMEIER; CARLINI, 1981).

No presente estudo, as drogas provenientes de *E. viscosa* não alteraram a coordenação motora no teste do *rota rod*, diferenciando-se do diazepam, que na dose de 1 mg/kg apresentou significativo efeito relaxante muscular, visto que diminuiu o tempo de permanência na barra (PEREZ *et al.*, 1998; AMOS *et al.*, 2001). Estes resultados indicam que as ações das drogas são provavelmente desprovidas de efeito relaxante muscular, mas resultantes de uma possível ação central.

A investigação sobre o potencial efeito ansiolítico das drogas teve sequência com a exposição de camundongos aos aparatos labirinto em cruz elevado (LCE). A premissa desse teste baseia-se na aversão que roedores têm a locais elevados, abertos e desconhecidos, o que tende a afastá-los, pois são considerados instintivamente locais potencialmente perigosos. Portanto, quanto mais os animais se expõem a situações consideradas perigosas, isto é, aos braços abertos do LCE, supõe-se que menos “ansiosos” estarão. (TREIT, 1993; BOISSIER; SIMON, 1962).

Visando confirmar o efeito ansiolítico do extrato etanólico e do diterpeno CZA anteriormente observado no teste do campo aberto, foi usado o teste do labirinto em cruz elevado (LCE). No referido modelo, é esperado que animais não tratados com ansiolíticos gastem mais tempo nos braços fechados devido a ansiedade filogeneticamente determinada (TREIT, 1993). O modelo em questão é mais popular para pesquisas de novos agentes ansiolíticos do tipo benzodiazepínicos, haja vista sua sensibilidade em detectar efeitos ansiolíticos de drogas que agem no receptor GABA<sub>A</sub>/Benzodiazepínico. De fato, vários estudos demonstram diferenças de resultados entre o diazepam, um benzodiazepínico, e outros ansiolíticos detentores de mecanismos de ação diversos. Exemplificando, o agonista parcial da serotonina buspirona, apresenta efeitos inconsistentes sobre os parâmetros observados no teste do labirinto em cruz elevado. Enquanto que o DZP produz efeitos ansiolíticos sobre no referido teste, a buspirona apresenta resultados muito variáveis (PELOW *et al.*, 1985; ZANGROSSI, 1997).

O diazepam, aumentou de forma significativa todos os parâmetros indicativos de efeito ansiolítico, o que era esperado como droga padrão ouro do teste. As drogas derivadas de *E.*

*viscosa* em todas as doses aplicadas, promoveram o efeito ansiolítico no LCE que não é influenciado por alterações na atividade locomotora, como observado anteriormente no teste do campo aberto e do *rota rod*, o que descarta a possibilidade de efeitos falso-positivos no modelo.

Considerando o potencial efeito ansiolítico do extrato e do diterpeno furânico CZA apresentado no LCE, resolvemos investigar o possível envolvimento do sistema gabaérgico neste efeito. Para isto escolheu-se tratamento prévio dos animais com flumazenil e utilizar o aparato LCE por este ser mais sensível na triagem de drogas ansiolíticas do tipo benzodiazepínicas (PELOW *et al.* 1985; RODGERS; CAO; DALVI; HOLMES, 1997). De acordo com trabalhos anteriores, a administração de flumazenil, um antagonista competitivo do receptor GABA<sub>A</sub>/Benzodiazepínico, é capaz de prevenir no LCE os efeitos ansiolíticos do diazepam e de drogas com mecanismos de ação similares (DE ALMEIDA *et al.*, 2012).

A análise dos resultados indicou que as maiores concentrações das drogas (EE200 e CZA50) apresentaram resultados significativos em aumentar tanto o número de entradas (NEBA), tempo de permanência (TPBA) e porcentagem do tempo de permanência (PTPA) dos camundongos nos braços abertos. O flumazenil reverteu o efeito ansiolítico das drogas em todos os parâmetros analisados, do mesmo modo que reverteu os efeitos do diazepam, sugerindo assim, que a administração das drogas desencadeia um efeito ansiolítico, e, este efeito parece estar relacionado com o sistema gabaérgico, mais especificamente com os receptores GABA<sub>A</sub>/Benzodiazepínico.

Posteriormente, investigamos o possível efeito antidepressivo das drogas nos testes nado forçado e de consumo de sacarose. O interesse em investigar também o efeito antidepressivo de *E. viscosa* foi motivada pelos possíveis resultados centrais nos modelos previamente avaliados. Externamente, algumas características envolvendo a patologia e seus tratamento também serviram como impulsionador da realização dos testes, tais como o conhecimento prévio da alta incidência mundial de casos de depressão; a heterogeneidade da resposta clínica às drogas antidepressivas e estabilizadoras do humor atualmente disponíveis e, finalmente, à susceptibilidade aos efeitos adversos (LERER; MACCIARDI, 2002).

Os dois modelos animais em questão, estão entre os mais amplamente utilizados para *screening* de drogas com efeito antidepressivo (FRANKOWSKA *et al.*, 2007), e apresentam



facilidade de uso, confiabilidade, especificidade e sensibilidade à administração aguda de antidepressivos (HENNINGSEN *et al.*, 2009).

No modelo do nado forçado, os animais são expostos a uma situação estressante e inescapável que gera um comportamento inicial de luta/fuga. Ao longo do experimento esse comportamento de luta tende a diminuir, sendo alternado com períodos de imobilidade. Essa imobilidade está relacionada a um comportamento de desespero e depressão mental. Portanto, a diminuição significativa do tempo de imobilidade de um grupo padrão-positivo ou teste em relação ao grupo controle, sugere uma resposta antidepressiva (STERU *et al.* 1985).

No modelo da supressão de sacarose os animais são expostos previamente a uma adaptação onde é ministrada solução de sacarose, e, posteriormente emprega-se uma situação de estresse causada por jejum de água e alimento de 24h, ocorrendo sequencialmente a administração simultânea de uma garrafa com água pura e outra com uma solução de sacarose a 3%. O consumo significativamente aumentado da solução de sacarose em relação aquela contendo água pura (*tap water*) indica uma resposta antidepressiva da droga em questão (MAO *et al.*, 2014).

Estudos têm demonstrado que a exposição a eventos estressantes aumentam a vulnerabilidade a depressão. Os modelos agudos de depressão são induzidos rapidamente em uma ou duas sessões e podem responder à administração aguda, subaguda ou subcrônica de antidepressivos (KITADA *et al.*, 1981). Em nosso estudo a depressão foi induzida de forma aguda. Foi utilizado como indutor o lipopolissacarídeo (LPS) de *Escherichia coli*, cepa 055:B5 (SigmaAldrich Corp., St Louis, USA). Visando observar potencial terapêutico tanto preventivo como de tratamento, os grupos animais foram divididos naqueles onde as drogas foram administradas anteriormente ao LPS (pré-LPS), e naquelas onde as mesmas foram administradas após a administração do indutor de efeito semelhante à depressão (pós-LPS).

Embora permaneça controversa a relação entre a imobilidade animal desencadeada nos modelos e a depressão humana, uma grande variedade de compostos antidepressivos e com potencial antidepressivo reduzem o tempo de imobilidade nos testes do nado forçado (MELO *et al.*, 2011; TEIXEIRA *et al.*, 2011). Além disso, demonstrou-se em outro estudo que camundongos geneticamente modificados que apresentavam supressão da enzima monoamino

oxidase (MAO) tiveram uma diminuição significativa no tempo de imobilidade no teste do nado forçado em relação aos animais do grupo controle, fato que fortalece a relação entre a imobilidade animal e a depressão humana (CASES *et al.*,1995).

Em nosso estudo, a administração do extrato etanólico (100 e 200 mg/kg), bem como do diterpeno isolado de *E. viscosa* CZA (25 e 50 mg/kg), via oral e em ambas as doses diminuíram significativamente o tempo de imobilidade no teste do nado forçado, bem como aumentaram a preferência por sacarose no teste as preferência de sacarose. A imipramina (10 mg/kg) usada como padrão positivo também desencadeou diminuição do tempo de imobilidade e na preferência por sacarose, conforme o esperado. Esses resultados advindos da administração das drogas-teste não parecem ter relação com um aumento da atividade locomotora, mas sim com um efeito antidepressivo, pois nessas doses não foi observado alteração da atividade locomotora espontânea dos animais no teste do campo aberto.

A fim de se investigar o possível envolvimento do sistema monoaminérgico no no efeito antidepressivo gerado pelas drogas-teste, submetemos os animais ao teste do nado forçado com animais submetidos ao agente indutor de estado semelhante a depressão LPS após a administração combinada das duas concentrações diferentes do extrato etanólico (EE100 e EE200) e com a melhor dose do CZA em termos de tempo de imobilidade no teste inicial (CZA50) com antagonistas farmacológicos da transmissão monoaminérgica. Sabe-se que o sistema monoaminérgico é um dos mais importantes alvos na fisiopatologia e tratamento da depressão. Esta desordem tem sido associada à deficiência funcional da neurotransmissão monoaminérgica e, atualmente, a maioria dos antidepressivos usados na clínica exercem seus efeitos primários através de regulação das concentrações sinápticas desses neurotransmissores (KULKARNI; BHUTANI; BISHNOI , 2008; MACHADO *et al.*, 2009).

Estudos demonstram que o sistema dopaminérgico desempenha um papel na regulação do humor (DAILLY *et al.*, 2004) e que a potenciação da neurotransmissão dopaminérgica induzida por tratamentos antidepressivos crônicos pode contribuir para o seu efeito terapêutico (D'AQUILA *et al.*, 2000). Também estão associadas uma consideráveis evidências farmacológicas sobre a eficácia dos antidepressivos com efeitos dopaminérgicos no tratamento da depressão (PAPAKOSTAS, 2004).

Para verificar a possível participação do sistema dopaminérgico na mediação do efeito antidepressivo das drogas derivadas da *E. viscosa*, pré-tratamos diferentes grupos com SCH23390 (antagonista dos receptores dopaminérgicos do tipo D<sub>1</sub>) ou com amisulpirida (antagonista dos receptores dopaminérgicos do tipo D<sub>2</sub>) e, posteriormente, administramos nestes mesmos grupos de animais as drogas em estudo, por via oral. Pode-se observar em seguida que o tempo de imobilidade no TNF foi significativamente maior naqueles grupos pré-tratados com os antagonistas dos receptores D<sub>1</sub> ou D<sub>2</sub> do que nos grupos tratados apenas com o extrato etanólico e com o diterpeno CZA. A análise deste resultado nos faz sugerir que o efeito antidepressivo dessas drogas depende em parte da disponibilidade dos receptores D<sub>1</sub> e D<sub>2</sub>. Estes resultados estão de acordo com dados da literatura que indicam que ambos os receptores D<sub>1</sub> e D<sub>2</sub> podem desempenhar um papel relevante na depressão (YAMADA *et al.*, 2004; TEIXEIRA *et al.*, 2014).

Paralelamente ao dopaminérgico, outro sistema, o noradrenérgico, também tem sido alvo valioso de antidepressivos. A depressão parece estar associada, pelo menos em parte, a uma hipofunção do sistema noradrenérgico, e alguns antidepressivos agem aumentando a disponibilidade sináptica de norepinefrina (ELHWUEGI, 2004; TAYLOR, 2005). Estudos demonstraram uma possível participação dos adrenoceptores  $\alpha_1$  e  $\alpha_2$  na mediação de respostas à drogas antidepressivas em modelos de depressão (KITADA *et al.*, 1981; MASUDA *et al.*, 2001, MELO *et al.*, 2011). No presente estudo, o pré-tratamento de camundongos com prazosina (antagonista  $\alpha_1$ -adrenérgico) foi capaz de reverter o efeito antidepressivo do extrato etanólico de *E. viscosa*, bem como do diterpeno CZA, o mesmo não acontecendo com a ioimbina (antagonista  $\alpha_2$ -adrenérgico), sendo que este não foi capaz de reverter o efeito antidepressivo. Estes resultados indicam que as drogas-teste podem exercer o seu efeito no teste do nado forçado, pelo menos em parte, ao interagir com adrenoceptores  $\alpha_1$ .

Conforme demonstra o grande número de estudos experimentais e clínicos, o sistema serotoninérgico está fortemente associado à regulação neural do humor e, anormalidades na neurotransmissão serotoninérgica estão presentes na patofisiologia da depressão (WONG; LICINIO, 2001). De fato, drogas que afetam a neurotransmissão serotoninérgica, como os inibidores da recaptação de 5-HT nos terminais nervosos e os inibidores do metabolismo das monoaminas (Inibidores da MAO) são eficazes no tratamento da depressão (WONG; LICINIO, 2001; ELHWUEGI, 2004). Dadas as razões acima, optamos também por avaliar os efeitos do sistema serotoninérgico sobre a atuação dos derivados de *E. viscosa* no teste do nado forçado. O

mesmo foi feito com auxílio de antagonistas, assim como o ocorrido nas análises dos sistemas dopaminérgico e noradrenergico.

Um inibidor da triptofano hidroxilase, 4- cloro-DL-fenil-alanina, conhecido pela sigla PCPA, foi administrado na dose de 100 mg/kg por quatro dias consecutivos. Estudos têm demonstrado que a administração do PCPA em camundongos reduz as reservas endógenas de 5-HT em 60% por efeito direto na via metabólica da mesma, sem alterar os níveis de noradrenalina e dopamina.

Em nosso estudo, o pré-tratamento dos animais com PCPA, reverteu o efeito anti-imobilidade das drogas no teste do nado forçado. Devido a este resultado, sugerimos que a ação antidepressiva da substância teste está relacionada, pelo menos em parte, com a ativação central de receptores serotoninérgicos. Diante do exposto, investigamos a possível participação de alguns receptores serotoninérgicos no efeito anti-imobilidade observado no TNF. O uso de um inibidor seletivo dos receptores 5-HT1A (NAN 190 0,5 mg/kg), também foi capaz de inibir o efeito antidepressivo das drogas estudadas, indicando que o sistema serotoninérgico também é responsável, em parte pelos efeitos antidepressivos das drogas extraídas de *E. viscosa* e que de uma forma mais específica, os receptores 5-HT1A estão envolvidos nesses efeitos.

Quanto às avaliações neuroquímicas, foi avaliado se o extrato etanólico e o diterpeno furânico exerciam algum efeito nos sistemas inflamatório e oxidativo cerebral. Procurou-se observar o efeito na prevenção (pré-tratamento) e no tratamento (pós-tratamento) dos sintomas tipo depressão causados pela administração intraperitoneal de LPS.. Em nosso estudo, pré e pós-tratamento com as drogas e IMI restauraram as reduções induzidas por LPS no conteúdo de nitrito. Assim, um relatório anterior indica que o inibidor não seletivo da NO sintase NG-nitro-L-arginina (L-NAME) aumentou o comportamento de doença induzida por LPS em ratos, sugerindo, assim, que o NO endógeno não atua como um mediador de comportamento depressivo induzido por LPS, mas pode sim ter um papel protetor (RIBEIRO *et al.*, 2013).

Uma possível explicação para os baixos níveis de nitrito observados nos nossos resultados é o possível papel do NO endógeno restringindo a ativação do eixo hipotalâmico-pituitário-supra-renal (HPA) durante períodos de aumento da citoquina e /ou a secreção de neuropeptídeo, como durante estimulação imunológica (URIBE *et al.*, 1999;. JANKORD *et al.*,

2009). De nota, um estudo recente mostrou que os pacientes com transtornos de humor exibem diminuição dos níveis de nitrito / nitrato no líquido cefalorraquidiano, indicando uma diminuição mais geral da produção de NO nesta desordem (GAO *et al.*, 2012). Além disso, foi anteriormente demonstrado que tanto a falta como o excesso de NO podem resultar em comportamento tipo depressivo. (HU *et al.*, 2012; MELO, 2012).

O tratamento com LPS sistêmico promove a ativação da microglia, com um aumento resultante na produção de ROS em tecidos cerebrais (CHUNG *et al.*, 2010;. SPULBER *et al.*, 2012.). Assim, observamos que o tratamento com LPS promoveu uma diminuição da GSH, juntamente com um aumento na peroxidação lipídica em áreas do cérebro relacionadas com a regulação do humor. Importante, tanto as drogas derivadas de *E. viscosa* como a IMI, tiveram a atividade antidepressiva evitada e revertida estas alterações, sendo estes resultados ainda não relatados na literatura. Tem sido sugerido que os mecanismos antioxidantes desempenham um papel na ação do fármaco antidepressivo (LEE *et al.*, 2012). É possível inferir que o suposto efeito antidepressivo é devido, em parte, às propriedades das drogas na estabilização da migroglia (CHO, et al., 2009), com um decréscimo correspondente na produção de IL-1B, que por sua vez pode prevenir e reverter a ativação da indoleamina- 2,3- dioxigenase (IDO), e assim aumentar a neurotransmissão de serotonina.

Curiosamente, antidepressivos clássicos também estabilizam as células microgliais estimuladas por LPS (TYNAN *et al.*, 2012). Essas observações podem explicar o porque do extrato, do CZA e IMI terem efeitos comportamentais e neuroquímicos semelhantes em nossas condições experimentais, visto que nossos estudos com os antagonistas farmacológicos demonstraram que os mesmos foram capazes de atuar na via das monoaminas, indicando que a ativação do microglia pode ser o evento fisiopatológico central capaz de gerar o efeito tipo depressivo decorrente da administração de LPS. O tratamento com o extrato etanólico de *E. viscosa*, seu metabólito isolado (CZA), bem como o antidepressivo clássico imipramina (IMI) também foram capazes de reduzir a concentração de espécies reativas de ácido tiobarbitúrico (TBARS), sendo esse efeito uma evidência de atuação dessas drogas na redução de espécies reativas de oxigênio (EROs).

A mieloperoxidase (MPO) é uma enzima conhecida por sua importante atividade pró-oxidativa e pró-inflamatória, sintetizada durante a diferenciação mielóide e está presente principalmente em grânulos azurófilos de neutrófilos (ARAÚJO *et al.*, 2011). Essa enzima utiliza

o íon cloreto ( $\text{Cl}^-$ ) na presença de peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) para gerar o ácido hipocloroso ( $\text{HOCl}$ ), um potente oxidante que em condições fisiológicas normais é capaz de funcionar como um importante agente antimicrobiano (ARAÚJO, 2015). No entanto, em situações de intensa ativação celular, o excesso de MPO pode ser prejudicial. Diversos estudos apontam o envolvimento de níveis elevados da atividade dessa enzima à alterações inflamatórias e a formação de espécies reativas de oxigênio em doenças, como a esclerose múltipla, arteriosclerose e Alzheimer (VELLOSA *et al.*, 2013).

Com base nessas informações, nosso estudo ao analisar os níveis de MPO buscou verificar possíveis alterações inflamatórias associadas a indução de estado depressivo induzido por LPS. De fato, os animais que receberam o LPS apresentaram níveis elevados de MPO, ou seja, atividade aumentada da enzima, quando comparados aos animais tratados apenas com salina.

As alterações inflamatórias indicadas pelo aumento de MPO foram significativamente revertidas pelo extrato etanólico e pelo diterpeno CZA em todas as áreas cerebrais quando os mesmos foram aplicados visando prevenir os efeitos do LPS sobre esse parâmetro. O mesmo ocorreu quando se utilizou as drogas posteriormente à aplicação do LPS, onde as mesmas conseguiram reverter significativamente esse efeito no córtex pré-frontal dos camundongos. Os resultados encontrados permite ao nosso grupo de estudo sugerir que o extrato etanólico nas concentrações de 100 e 200 mg/kg (EE100 e EE200), bem como o colizaleucolídeo A nas concentrações de 25 e 50 mg/kg (CZA25 e CZA50) exercem um possível papel inibitório sobre MPO e na reversão de alterações inflamatórias.

Uma atividade anti-inflamatória aumentada na depressão pode estar presente como uma maneira de neutralizar ou limitar processos pró-inflamatórios em curso e evitar o desenvolvimento de inflamação crônica (BOROVCANIN *et al.*, 2013).

Essa avaliação pré-clínica abre perspectivas para posteriores experimentos com as drogas em destaque, o que pode culminar em seu futuro uso pela indústria farmacêutica e, conseqüentemente, pela população como um todo, na prevenção ou tratamento dos quadros de depressão e ansiedade. Estudos complementares, como *binding*, capaz de detalhar mecanismos e a cinética das drogas, o *real time* PCR, uma técnica de biologia molecular capaz de demonstrar quantitativamente o aumento da atividade de um determinado receptor através do incremento da

síntese de DNA celular, e dosagem de citocinas, representantes da ação do sistema imune, são indicados para estudos posteriores.

Por fim, os dados encontrados em nosso trabalho revelaram que o constituinte majoritário, o diterpeno colizaleucolídeo A, foi responsável em parte pelas ações tipo antidepressivas e tipo ansiolíticas do extrato etanólico. A interação complexa entre as outras substâncias presentes no extrato bruto e o constituinte majoritário foram capazes de inserir mudanças condideráveis entre os perfis estudados das duas drogas.

**CONCLUSÃO**

---

---



## 7 CONCLUSÕES

Finalizando, através da associação de estudos comportamentais e determinações neuroquímicas, demonstrou-se que a administração do extrato etanólico de *Egletes viscosa*, nas doses de 100 e 200 mg/kg, bem como de seu constituinte majoritário, o diterpeno furânico colizaleucolídeo A, nas doses de 25 e 50 mg/kg, produziram efeitos ansiolíticos e antidepressivos. Também foi observado que nas mesmas doses estudadas não foi demonstrada influência estimulante motor ou relaxante muscular, considerados efeitos colaterais importantes nas drogas clássicas. Adicionalmente, as drogas estudadas foram submetidas a dois modelos animais preditivos de propriedades antidepressivas (nado forçado e supressão de sacarose, ambos tendo o LPS i.p como agente indutor dos sintomas tipo depressivo) e sua ação parece estar mediada, pelo menos em parte, a interação com os sistemas dopaminérgico (receptores D<sub>1</sub> e D<sub>2</sub>), noradrenérgico (receptor alfa<sub>1</sub>) e serotoninérgico (receptor 5HT<sub>1A</sub>). Os dados neuroquímicos relacionando o estresse oxidativo e resposta inflamatória mostraram o extrato etanólico e o diterpeno furânico CZA atuando na redução dos níveis de nitrito, TBARS e MPO, assim como na elevação dos níveis de GSH, indicando que o material vegetal atua nos mecanismos inflamatório e oxidativo fisiopatológico da depressão.

## REFERÊNCIAS

ADEREM, A.; ULEVITCH, R. J. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. **Nature**, v. 406, n. 6797, p. 782-787, 2000.

AGRA, M. F; BARACHO, G. S; NURIT, K.; BASÍLIO, I. J. L. D; COELHO, V. P. M. Medicinal and poisonous diversity of the flora of "Cariri Paraibano", **Brazil. J Ethnopharmacol** doi:10.1016. 2007

AHMAD, V. U.; HUSSAIN, H.; BURKHARI, I. A.; HUSSAIN, J.; JASSBI, A. R.; DAR, A. Antinociceptive diterpene from *Euphorbia decipiens*. **Fitoterapia**, v. 76, p. 230-232. 2005.

ALLEN, K. L.; WALDVOGEL, H. J.; GLASS, M.; FAULL R. L. Cannabinoid (CB(1)), GABA(A) and GABA(B) receptor subunit changes in the globus pallidus in Huntington's disease. **J. Chem. Neuroanat.** v. 37(4), p. 266-81, 2009.

AMARAL, K. M.; SCHENKEL, E.; LANGELOH, A. Avaliação da toxicidade reprodutiva dos extratos aquosos liofilizados de *Passiflora alata*, *Dryander* e *Passiflora edulis* SIMS em ratas Winstar. **Acta Farmacêutica Bonarense**, v. 26, p. 369-373, 2001.

AMOS, S.; ADZU, B.; BINDA, L.; WAMBEBE, C.; GAMANIEL, K. Neuropharmacological effect of the aqueous extract of *Sphaeranthus senegalensis* in mice. **J. Ethnopharmacology**, v. 78, p. 33-37, 2001.

ANDREAZZA, A. C.; FREY, B. N.; ERDTMANN, B.; SALVADOR, M.; ROMBALDI, F.; SANTIN, A.; GONCALVES, C. A.; KAPCZINSKI, F. DNA damage in bipolar disorder. **Psychiatry Res.**, v. 153, n. 1, p. 27-32, 2007.

ANSSEAU M.; DEMYTTENAERE K.; HEYRMAN J.; MIGEOTTE A.; LEYMAN S.; MIGNON A. Objective: remission of depression in primary care. **The Oreon Study. European Neuropsychopharmacology**, v. 19 (3), pp. 169-176, 2009.

ARCHER, J. Tests for emotionality in rats and mice: a review. **Anim. Behav.**, v.21, n.2, p.205-235, 1973.

ARAÚJO, F. Y. R.; DE OLIVEIRA, G. V.; GOMES, P. X. L.; SOARES, M. A.; MACÊDO, D. S. Inhibition of ketamine-induced hyperlocomotion in mice by the essential oil of *Alpinia zerumbet*: possible involvement of an antioxidant effect. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 63, p. 1103-1110, 2011.

ARAÚJO, T. S. Papel da via das quinureninas na reversão de sintomas e alterações neuroquímicas tipo-esquizofrenia induzidos pela administração repetida de cetamina em camundongos. Departamento de Fisiologia e Farmacologia. **Universidade Federal do Ceará**. 2015.

ASHDOWN, H.; DUMONT, Y.; N. G. M.; POOLE, S.; BOKSA, P.; LUHESHI, G. N. The role of cytokines in mediating effects of prenatal infection on the fetus: implications for schizophrenia. **Molecular Psychiatry**, v. 11, n. 1, p. 47-55, 2006.

BARTON, D. H. R.; ELAD, D. J. Colombo root bitter principles. The functional groups of columbin. **J. Chem. Soc.** 2085-2095. 1956.

BARLOW, D. H. Transtorno do pânico e agoraphobia. In: BARLOW, David H. **Manual clinic de transtornos psicológicos**. 2ª edição. Porto Alegre. Artmed. 1999.

BARROS, H. M.; TANNHAUSER, S. L.; TANNHAUSER, M. A. The effects of GABAergic drugs on grooming behaviour in the open field. **Pharmacol toxicol**, p. 339-344. 1994.

BAUER, S. The neurotrophic cytokine family in development, plasticity, disease and injury. **Nat. Rev. Neurosci.**, v. 8, p. 221-232, 2007.

BECK, A.; YOUNG, J. E.; WEINBERGER, A. Depressão. Em D.H. Barlow, (org.) **Manual clínico dos transtornos psicológicos**, cap. 06, 273-312. Porto Alegre (RS). Artes Médicas. 1999.

BENKERT, O.; HOLSBOER, F. Effect of the sulphiride in endogenous depression. **Acta Psychiatrica Scandinavica**, v. 69, p. 43-48, 1984.

BERMAN, R. M.; MARCUS, R. N.; SWANINK, R. The efficacy and safety of aripiprazole as adjunctive therapy in major depressive disorder: a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled study. **J. Clin. Psychiatry**; v. 68(6), p. 843-53; 2007.

BERROCOSO, E.; IKEDA, K.; SORA, I.; UHL, G.R.; SÁNCHEZ-BLÁZQUEZ, P.; MICO, J.A. Active behaviours produced by antidepressants and opioids in the mouse tail suspension test. **Int J Neuropsychopharmacol.** Feb;16(1):151-62. 2013.

BLOCK, M. L.; HONG, J. S. Microglia and inflammation-mediated neurodegeneration: multiple triggers with a common mechanism. **Prog. Neurobiol.**, v. 76, p. 77–98, 2005.

BLUMENTHAL, M.; GOLDBERG, A.; BRINCKMANN, J. **Herbal Medicine – Expanded Commission and Monographs.** Newton: American Botanical Council, 2000.

BLUTHE, R. M. Lipopolysaccharide induces sickness behaviour in rats by a vagal mediated mechanism. The first demonstration that section of the vagus nerves blocks immune-to-brain communication and abrogates lipopolysaccharide-induced sickness behaviour without compromising the peripheral immune response. **C R Acad. Sci.** III, v. 317, p. 499–503, 1994.

BOISSIER, J. R.; SIMON, P. La reaction d'exploration chez la souris. **Therapie.** v. 17, 1225-1232. 1962.

BOROVCANIN, M. Antipsychotics can modulate the cytokine profile in schizophrenia: attenuation of the type-2 inflammatory response. **Schizophrenia research**, v. 147, n. 1, p. 103-9, 2013.

BRADLEY, P. P.; PRIEBAT, D. A.; CHRISTENSEN, R. D.; ROTHSTEIN, G. Measurement of Cutaneous Inflammation: Estimation of Neutrophil Content with an Enzyme Marker. **Journal of investigative pharmacology**, v. 78, i. 3, p. 206-209. 1982.

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

DE ALMEIDA, A. A.; COSTA, J. P.; DE CARVALHO, R. B.; DE SOUSA, D. P.; DE FREITAS, R. M. Evaluation of acute toxicity of a natural compound (+)- limonene epoxide and its anxiolytic likeaction. **Brain Res.** 2012.

DE KLOET, E. R.; VREUGDENHIL, E.; OITZL, M. S.; JOËLS, M. Brain corticosteroid receptor balance in health and disease. **Endocr Rev.** Jun;19(3): 269-301. 1998.

DIAS, B. F. S. A implementação da convenção sobre diversidade biológica no Brasil: desafios e oportunidades. 1.ed. Campinas: **André Tosello**, p. 10, 1996.

DIAS, M. L. Atividade antinociceptiva da riparina IV: participação dos receptores TRPV1, TRPM8, receptores glutamatérgicos e do óxido nítrico. Dissertação (mestrado) – Programa de pós-graduação em Farmacologia, **Universidade Federal do Ceará**, Fortaleza, 2011.

DRAPER, H. H.; SQUIRES, E. J.; MAHMOODI, H.; WU, J.; AGARWAL, S.; HADLEY, M. A. comparative evaluation of thiobarbituric acid methods for the determination of malondialdehyde in biological materials. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 15:353e 63. 1993.

DZEROSKI, S.; SCHULZE-KREMER, S.; HEIDTKE, K.; SIEMS, K.; WETTSCHERECK, D.; BLOCKEEL, H. Diterpene structure elucidation from <sup>13</sup>C NMR spectra with inductive logic programming. **Applied artificial intelligence**, v. 12, p. 363-384. 1998.

DUNHAM, N. W.; MIYA, T. S. A note on a simple apparatus for detecting neurological deficits in rats and mice. **J. Am. Pharm. Assoc.**, v. 46(3), p. 208, 1957.

DUNN, A. J. Effects of cytokines and infections on brain neurochemistry. **Clinical Neuroscience Research**, v. 6, n. 1-2, p. 52-68, 2006.

ELLMAN, G. L. Tissue sulfhydryl groups. **Archives of Biochemistry and Biophysics** v. 82:70 e. 7. 1959.

ELHWUEGI A. S. Central monoamines and their role in major depression. **Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry**. v. 28, p. 435–451, 2004.

ES COP. **European Scientific Cooperative on Phytotherapy Monograph on the Medicinal Uses of Plant**. United Kingdom: Exeter, 1997.

FAUSTINO, T. T.; ALMEIDA, R. B. de; ANDREATINI, R. Plantas medicinais no tratamento do transtorno de ansiedade generalizada: uma revisão dos estudos clínicos controlados. **Rev. Bras. Psiquiatr.**, São Paulo, v. 32, n. 4, 2010.

FERNÁNDEZ, S.; WASOWSKI, C.; PALADINI, A. C.; MARDER, M. Sedative and sleep-enhancing properties of linarin, a flavonoid-isolates from *Valeriana officinalis*. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 77, p. 399-404, 2004.

FENTON, M. J.; GOLENBOCK, D. T. LPS-binding proteins and receptors. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 64, n. 1, p. 25-32, 1998.

FLÜGGE, G.; VAN KAMPEN, M.; MEYER, H.; FUCHS, E.  $\alpha$ 2A and  $\alpha$ 2C-adrenoceptor regulation in the brain:  $\alpha$ 2A changes persist after chronic stress. **Eur J Neurosci**;v. 17, p. 917-28, 2003.

FRANKOWSKA, M.; FILIP, M.; PRZEGALIŃSKI, E. Effects of GABAB receptor ligands in animal tests of depression and anxiety. **Pharmacol Reports**, v. 59, 645-655, 2007.

GALDINO, P. M.; NASCIMENTO, M. V.; SAMPAIO, B. L.; FERREIRA, R. N.; PAULA, J. R.; COSTA, E. A. Antidepressant-like effect of Lafoensiapacari A. St.-Hil. ethanolic extract and fractions in mice. **J Ethnopharmacol**. V.124 ( 3), pp.581-585, 2009.

GALOFRÉ, M.; BABOT, Z.; GARCÍA, D.A.; IRAOLA, S.; RODRÍGUEZ-FARRÉ, E.; FORSBY A.; SUÑOL, C. GABA<sub>A</sub> receptor and cell membrane potential as functional endpoints in cultured neurons to evaluate chemicals for human acute toxicity. **Neurotoxicol Teratol**. v. 32(1), p.52-61, 2010.

GAO, S. F.; QI, X. R.; ZHAO, J.; BALESAR, R.; BAO, A. M.; SWAAB, D. F. Decreased NOS1 expression in the anterior cingulate cortex in depression. **Cerebral Cortex**; 17:17. 2012.

GARDNER, A.; BOLES, R. G. Beyond the serotonin hypothesis: mitochondria, inflammation and neurodegeneration in major depression and affective spectrum disorders. *Progr. Neuropsychopharmacol.* **Biol. Psychiatry**, special issue, 2010.

GERACIOTI, T. D, BAKER, D.G.; EKHATOR, N. N.; WEST, S. A.; HILL, K. K.; BRUCE, A. B.; SCHMIDT, D.; ROUNDS-KUGLER, B.; YEHUDA, R.; KECK, P. E.; KASCKOW, J. W. CSF norepinephrine concentrations in posttraumatic stress disorder. **Am J Psychiatry**. p. 158(8): 1227-30, 2001.

GIRAL, F. Produtos químicos e farmacêuticos. **Atribute**, 1956.

GODBOUT, J. P.; ABRAHAM, J.; RICHWINE, A. F.; BERG, B. M.; KELLEY, K. W.; JOHNSON, R. W. Exaggerated neuroinflammation and sickness behavior in aged mice following activation of the peripheral innate immune system. **Faseb J.**, v. 19, n. 10, p. 1329-1331, 2005.

GOLDBERG, J. F.; BURDICK, K. E.; ENDICK, C.J.; GOMES, B.; FEITOSA, M. Anxiolytic-like effect of the monoterpene 1,4-cineole in mice. **Pharmacol Biochem Behav.** 2010.

GRAEFF, E. U.; WITTING, J.; MUELLER, S.; RIETHLING, A. K.; UEHLEKE, B.; DREWELOW, B.; PFORTE, H.; JACOBASCH, G.; DERENDORF, H.; VEIT, M. Pharmacokinetics and bioavailability of quercetin glycosides in humans. **Journal of Clinical Pharmacology**, v. 41, p. 492-499. 2001.

GREEN, L. C.; WAGNER, D. A.; GLOGOWSKI, J.; SKIPPER, P. L.; WISHNOK, J. S.; TANNENBAUM, S. R. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. **Analytical Biochemistry**, v. 126:131e 8. 1982.

GUEDES, M. M. Estudos dos efeitos antinociceptivos e gastrintestinais do extrato hidroalcoólico de *Egletes viscosa* Less e seus constituintes diterpenóides. Dissertação, Faculdade de Medicina, **Universidade Federal do Ceará**. 2002.

GUPTA, D.; BLEAKLEY, B.; GUPTA, R. K. Dragon's blood: botany, chemistry and therapeutic uses. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 115(3), 361-380. 2008.

HAMBURGER, M.; HOSTETTMANN, K. Bioactivity in plants: the link between phytochemistry and medicine. **Phytochemistry**, v. 30, p. 3864-3874, 1991.

HARJU, K.; OJANIEMI, M.; ROUNIOJA, S.; GLUMOFF, V.; PAANANEN, R.; VUOLTEENAHO, R.; HALLMAN, M. Expression of toll-like receptor 4 and endotoxinresponsiveness in mice during perinatal period. **Pediatric Research**, v. 57, n. 5, pt. 1, p. 644-648, 2005.

HART, B. L. Biological basis of the behavior of sick animals. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 12, n. 2, p. 123-137, 1988.

HASLER, G. Pathophysiology of depression: do we have any solid evidence of interest to clinicians? **World Psychiatry**; v. 9, p. 155-161, 2010.

HAVA, G.; VERED, L.; YAEL, M.; MORDECHAI, H.; MAHOUD, H. Alterations in behavior in adult offspring mice following maternal inflammation during pregnancy. **Developmental Psychobiology**, v. 48, n. 2, p. 162-168, 2006.

HENNINGSSEN K.; ANDREASEN J. T.; BOUZINOVA, V. B.; JAYATISSA, M. N.; JENSEN, M. S.; REDROBE, J. P.; WIBORG, O. **Cognitive** deficits in the rat chronic mild stress model for depression: Relation to anhedonic-like responses. **Behavioural Brain Research**.v. 198, 1, p. 136-141, 2009.

HIRUMA-LIMA, C. A.; TOMA, W.; GRACIOSO, J. D. E. S.; DE ALMEIDA, A. B.; BATISTA, L. M.; MAGRI, L.; DE PAULA, A. C.; SOARES, F. R.; NUNES, D. S.; SOUZA-BRITO, A. R.; Natural trans-crotonin: the antiulcerogenic effect of another diterpene isolated from the bark of *Croton cajucara* Benth. **Biol Pharm Bull**, v. 24, n. 4, p. 452-456. 2002.

HU, Y.; WU, D. L.; LUO, C. X.; ZHU, L. J.; ZHANG, J.; WU, H. Y. Hippocampal nitric oxide contributes to sex difference in affective behaviors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. 109: 14224e 9. 2012.

HUANG, Y.; HENRY, C. J.; DANTZER, R.; JOHNSON, R. W.; GODBOUT, J. P. Exaggerated sickness behavior and brain proinflammatory cytokine expression in aged mice in response to intracerebroventricular lipopolysaccharide. **Neurobiol. Aging**, v. 29, n. 11, 1744-1753. 2007.

JANKORD, R.; MCALLISTER, R. M.; GANJAM, V. K.; LAUGHLIN, M. H. Chronic inhibition of nitric oxide synthase augments the ACTH response to exercise. **American Journal of Physiology e Regulatory Integrative and Comparative Physiology**; v. 296: r. 728e 34. 2009.

JOHANSSON, C.; AHLENIUS, S. Evidence for the involvement of 5-HT<sub>1A</sub> receptors in the mediation of exploratory locomotor activity in the rat. **J. Psychopharmacol.**, v. 3, p. 32-35, 1989.

JUNG, M. E.; GATCH, M. B. The discriminative stimulus effects of pentylentetrazole as a model of anxiety: recent developments. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 26, p. 429- 439, 2002.



KAPLAN, H. I.; SADOCK, B. J. Comprehensive textbook of psychiatry. **New York:Lippincot Williams and Wilkins.** 2005.

KASTER, M. P.; RAUPP, I.; BINFARÉ, R. W.; ANDREATINI, R.; RODRIGUES, A. L. S. Antidepressant-like effect of lamotrigine in the mouse forced swimming test: evidence for the involvement of the noradrenergic system. **Eur J Pharmacol.** v. 565, p. 119–24, 2007.

KATZUNG, B. G. **Farmacologia Básica e Clínica.** 11<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: Artmed/McGraw-Hill, 2013.

KELLEY, K. W.; BLUTHE, R. M.; DANTZER, R.; ZHOU, J. H.; SHEN, W. H.; JOHNSON, R. W.; BROUSSARD, S. R. Cytokine-induced sickness behavior. **Brain Behav. Immun.**, v. 17, n. 1, Suppl., p. 112-118, 2003.

KEELEY, M. L.; STORCH, E. A. Anxiety disorders in youth. **Journal of Pediatric Nursing**, v. 24, (1), p. 26-40, 2009.

KIM, J.; GORMAN, J. The psychobiology of anxiety. **Clinical Neuroscience Research**, v. 4, p. 335-347. 2005.

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**, v. 22, pp 1055–1060. 1981.

KONNOPKA, A.; LEICHSENRING, F.; LEIBING, E.; KÖNIG, H. H. Cost-of-illness studies and cost-effectiveness analyses in anxiety disorders: a systematic review. **J Affect Disord.** v. 114(1-3), p.14-31, 2009.

KULKARNI, S. K.; BHUTANI, M. K.; BISHNOI, M. Antidepressant activity of curcumin: involvement of serotonin and dopamine system. **Psychopharmacology (Berl)**. v. 201(3):435-42. 2008.

KUPELI, E.; ERDEMOGLU, N.; YESILADA, E.; SENER, B. Antiinflammatory and antinociceptive activity of taxoids and lignans from the heartwood of *Taxus baccata* L. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 89, p. 265-270. 2003.

LEE, S. Y.; LEE, S. J.; HAN, C.; PATKAR, A. A.; MASAND, P. S.; PAE, C. U. Oxidative/nitrosative stress and antidepressants: targets for novel antidepressants. **Progress in Neuro- Psychopharmacology & Biological Psychiatry**. 2012.

LENT, R. As unidades do sistema nervoso. In: LENT, R. (Ed.). **Cem bilhões de neurônios: conceitos fundamentais de neurociência**. São Paulo: Atheneu, 2001. p. 65-95.

LEONARD B.E.: Evidence for a biochemical lesion in depression. **J Clin Psychiatry**, v. 61, pp.12-17, 2000.

LERER, B.; MACCIARDI, F. Pharmacogenetics of antidepressant and mood-stabilizing drugs: a review of candidate-gene studies and future research directions. **Int. J. Neuropsychopharmacol.**, v. 5(3), p. 255-75, 2002.

LEVITON, A.; DAMMANN, O.; DURUM, S. K. The adaptive immune response in neonatal cerebral white matter damage. **Annals of Neurology**, v. 58, n. 6, p. 821-828, 2005.

LI, J. W. H.; VEDERAS, J. C. Drug discovery and natural products: end of an era or an endless frontier? **Science**. v. 325, p.161–165, 2009.

LIMA, M. S. Epidemiologia e impacto social. **Rev. Bras. Psiquiatr.** São Paulo, 1999.

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

LOPEZ, A. D.; MURRAY, C. C. - The global burden of disease, 1990-2020. **Nat Med**. 4(11):1241-3, 1998.

MACHADO, A. B. M. **Neuroanatomia funcional**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 2000.

MACHADO, D. G.; BETTIO, L. E.; CUNHA, M. P.; CAPRA, J. C.; DALMARCO, J. B.; PIZZOLATTI, M. G.; RODRIGUES, A. L. Antidepressant-like effect of the extract of *Rosmarinus officinalis* in mice: involvement of the monoaminergic system. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**. 33(4):642-50. 2009.

MAES, M. A review on the acute phase response in major depression. **Rev. Neurosci.**, v. 4, n. 4, p. 407–416, 1993a.

MAES, M. Major depression and activation of the inflammatory response system. **Adv. Exp. Med. Biol.** v. 461, p. 25–46, 1999.

MAES, M. The cytokine hypothesis of depression: inflammation, oxidative & nitrosative stress (IO&NS) and leaky gut as new targets for adjunctive treatments in depression. **Neuro Endocrinol. Lett.** v. 29, n. 3, p. 287–291, 2008.

MAES, M.; LEONARD, B.; FERNANDEZ, A.; KUBERA, M.; NOWAK, G.; VEERHUIS, R.; GARDNER, A.; RUCKOANICH, P.; GEFFARD, M.; ALTAMURA, C.; GALECKI, P.; BERK, M. Editorial: (Neuro)inflammation and neuroprogression as new pathways and drug targets in depression: from antioxidants to kinase inhibitors. **Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry**. v. 35, n. 3, p. 659–663, 2011.

MAES, M.; YIRMYIA, R.; NORABERG, J.; BRENE, S.; HIBBELN, J.; PERINI, G.; KUBERA, M.; BOB, P.; LERER, B.; MAJ, M. The inflammatory & neurodegenerative (I&ND) hypothesis of depression: leads for future research and new drug developments in depression. **Metab. Brain Dis.**, v. 24, n. 1, p. 27–53, 2009.

MAES, M.; BOSMANS, E.; MELTZER, H. Y.; SCHARPE, S.; SUY, E. Interleukin-1 beta: a putative mediator of HPA axis hyperactivity in major depression? **Am. J. Psychiatry**, v. 150, n. 8, p. 1189–1193, 1993a.

MAES, M.; BOSMANS, E.; SUY, E.; VANDERVORST, C.; DEJONCKHEERE, C.; RAUS, J. Antiphospholipid, antinuclear, Epstein–Barr and cytomegalovirus antibodies, and soluble interleukin-2 receptors in depressive patients. **J. Affect Disord.** v. 21, n. 2, p. 133–140, 1991a.

MAES, M.; BOSMANS, E.; SUY, E.; VANDERVORST, C.; DEJONCKHEERE, C.; RAUS, J. Depression-related disturbances in mitogen-induced lymphocyte responses and interleukin-1 beta and soluble interleukin-2 receptor production. **Acta Psychiatr. Scand.**, v. 84, n. 4, p. 379–386, 1991b.

MAES, M.; BOSMANS, E.; SUY, E.; VANDERVORST, C.; JONCKHEERE, C.; RAUS, J. Immune disturbances during major depression: upregulated expression of interleukin-2 receptors. **Neuropsychobiology**, v. 24, n. 3, p. 115–120, 1990-1991c.

MAES, M.; GALECKI, P.; CHANG, Y. S.; BERK, M. A review on the oxidative and nitrosative stress (O&NS) pathways in major depression and their possible contribution to the (neuro) degenerative processes in that illness. **Progr. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiatry**. special issue, 2010.

MAES, M.; LAMBRECHTS, J.; BOSMANS, E.; JACOBS, J; SUY, E.; VANDERVORST, C. Evidence for a systemic immune activation during depression, results of leukocyte enumeration by flow cytometry in conjunction with monoclonal antibody staining. **Psychol. Med.** v. 22, n. 1, p. 45-53, 1992.

MAES, M.; SCHARPE, S.; MELTZER, H.Y.; BOSNMANS, E.; SUY, E.; CALABRESE, J.; COSYNS, P. Relationships between interleukin-6 activity, acute phase proteins, and function of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in severe depression. **Psychiatry Res.**, v. 49, n. 1, p. 11–27, 1993b.

MAES, M.; SCHARPE, S.; MELTZER, H.Y.; COSYNS, P. Relationships between increased haptoglobin plasma levels and activation of cell-mediated immunity in depression. **Biol. Psychiatry**, v. 34, n. 10, p. 690–701, 1993c.

MAES, M.; SMITH, R.; SHARPE, S. The monocyte-T-lymphocyte hypothesis of major depression. **Psychoneuroendocrinology**, v. 20, n. 2, p. 111-116, 1995.

MAES, M.; SONG, C.; YIRMIYA, R. Targeting Il-1 in Depression. **Expert Opin. Ther. Targets**, v. 27, p. 27, 2012.

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

MAO, Q.; HUANG, Z.; ZHONG, X.; XIAN, F.; IP, S. Brain-derived neurotrophic factor signaling mediates the antidepressant-like effect of piperine in chronically stressed mice. **Behavioural Brain Research**, v. 261, p. 140-145. 2014.

MATOS, F. J. A. Farmácias Vivas. Fortaleza: Editora: UFC, 1991.

MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais: guia de seleção e emprego de plantas usadas em fitoterapia no nordeste do Brasil**. Fortaleza: IU, 2000.

MATOS, F. J. A. **Plantas Mediciniais - guia de seleção e emprego de plantas usadas em fitoterapia no nordeste do Brasil**, Impr. Universitaria / Edições UFC, Fortaleza, p. 344, 2002.

MARGIS, R.; CORDIOLI, A. V. Idade Adulta: meia idade In: Eizirik, CL; Kapczinski, F; Bassols, MAS. **O Ciclo da Vida Humana: uma perspectiva psicodinâmica**. ARTMED, 2001.

MASUDA, Y.; OHNUMA, S.; SUGIYAMA, T.  $\alpha$ 2-adrenoceptor activity induces the antidepressant-like glycolipid in mouse forced swimming. **Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol.** v 23, p. 19– 21, 2001.

MCGEER, P. L.; MCGEER, E. G. Inflammation and the degenerative diseases of aging. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, v. 1035, p. 104–116, 2004.

MELO, C. L. Estudo farmacológico da ternatina, um flavonoides isolado de *Egletes viscosa*, LESS. **Acervo de teses e dissertações: Universidade Federal do Ceará**. 1991.

MELO, C. T. V.; DE CARVALHO, A. M.; MOURA, B. A.; TEIXEIRA, C. P.; VASCONCELOS, L. F.; FEITOSA, M. L.; DE OLIVEIRA, G. V.; BARBOSA-FILHO, J. M.; CHAVEZ GUTIERREZ, S. J.; DE FRANÇA FONTELES, M. M.; VASCONCELOS, S.M.; DE SOUSA, F.C. 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. **Fundam Clin Pharma**, in press. 2011.

MELLO, B. S. F. Determinação dos efeitos da doxiciclina em um modelo de depressão induzido por lipopolissacarídeo em camundongos / Bruna Stefânia Ferreira Mello. **Universidade Federal do Ceará**. 2012.

MEYER, U.; FELDON, J.; SCHEDLOWSKI, M.; YEE, B. K. Towards an immunoprecipitated neurodevelopmental animal model of schizophrenia. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 29, n. 6, p. 913-947, 2005.

MIMS, C.; PLAYFAIR, J.; ROITT, I.; WAKELIN, D.; WILLIAMS, R. **Microbiologia médica**. São Paulo: Manole, 1999.

MIYAKE, K. Innate recognition of lipopolysaccharide by CD14 and toll-like receptor 4-MD-2: unique roles for MD-2. **International Immunopharmacology**, v. 3, n. 1, p. 119-128, 2003.

MURATORE, C. S.; LUKS, F. I.; ZHOU, Y.; HARTY, M.; REICHNER, J.; TRACY, T. F. Endotoxin alters early fetal lung morphogenesis. **Journal of Surgical Research**, v. 155, n. 2, p. 225-230, 2009.

MURPHY, K.; TRAVERS, P.; WALPORT, M. Imunidade inata. In: MURPHY, K., TRAVERS, P.; WALPORT, M. (Ed.). **Imunobiologia de Janeway**. Porto Alegre: Artmed, 2010, p. 39-109.

MURRAY, C. A.; LYNCH, M. A. Evidence that increased hippocampal expression of the cytokine interleukin-1 beta is a common trigger for age- and stress- induce impairments in long-term potentiation. **J. Neurosci.**, v. 18, p. 2974-2981, 1998.

NABETA, K.; ISHIKAWA, T.; OKUYAMA, H. Sesqui- and di-terpene biosynthesis from c-13 labelled acetate and mevalonate in cultures cells of *Heteroscyphus planus*. **J. Chem. Soc. Perkin. Trans.** n. 24, p.3111-3115, 1995.

NEMEROFF, C. B. Improving Antidepressant Adherence. **J Clin Psychiatry**; v. 64, p. 25–30, 2003.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K. M. Natural products as a source of new drugs over the period 1981–2002. **J. Nat. Prod.** v. 66, p. 1002–1037, 2003.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Drugs and Leads to Drugs: The Historical Perspective. In: Buss, AD.; Butler, MS., editors. RSC Biomolecular Sciences No. 18; Natural Product Chemistry for Drug Discovery. **Royal Society of Chemistry**; Cambridge, UK. p. 3-27. 2010.

NISKANEN, P.; TAMMINEN T.; IUKARI, M. Sulpiride vs. amitriptyline in the treatment of depression, **Current Therapeutic Research**, v. 17(3), p. 281–284, 1975.

NUTT, D. J.; ARGYROPOULOS, S.; HOOD, S.; POTOKAR, J. Generalized anxiety disorder: a comorbid disease. **European Neuropsychopharmacology**, v. 16, p. 109-118. 2006.

OLIVEIRA, I. C. M. Efeitos centrais da riparina I de aniba riparina (NEES) mez (Lauraceae) em modelos comportamentais de ansiedade, depressão, sono e convulsão em camundongos. **Universidade Federal do Ceará**. 2012.

OMS. Organização Mundial de Saúde. **WHO monographs on selected medicinal plants, v. 1**, Malta: WHO Graphics, 1999.

OZTURK, Y.; AYDINI, S.; BEIS, R.; BASER, K. H. C.; BERBEROGLU, H. Effect of *Hypericum perforatum* L. and *Hypericum calximun* L. extract on the central nervous system in mice. **Phytomedicine**, v. 3, p. 139-146, 1996.

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

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. **J. Neurosci. Methods**, v. 14, p. 149-167, 1985.

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

PHILLIS, J. W. Cyclooxygenases, lipoxigenases, and epoxygenases in CNS: their role and involvement in neurological disorders. **Brain Res. Brain Res. Rev.**, v. 52, p. 201–243, 2006.

PIO CORREIA, M. Dicionário das plantas úteis do Brasil. Rio de Janeiro, ministério da Agricultura, v. 5. p. 19, 1974.

PITTLER, M. A.; EDZARD, E. Kava extract versus placebo for treating anxiety. **Cochrane database of systematic reviews**, v. I, art. CD003383, 2003.

PORSOLT, R. D.; BERTIN, A.; JALFRE, M. Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. **Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.**, v. 229, p. 327-36, 1977.

PROVENSI, G. Investigação da atividade ansiolítica de *Passiflora alata* Curtis (Passifloraceae). Programa de pós-graduação em ciências farmacêuticas. **Universidade Federal do Rio Grande do Sul**. 2007.

QUAN, N.; WHITESIDE, M.; HERKENHAM, M. Time course and localization patterns of interleukin-1beta messenger RNA expression in brain and pituitary after peripheral administration of lipopolysaccharide. **Neuroscience**, v. 83, p. 281–293, 1998.

RANG H. P.; DALE, M. M. **Farmacologia**. 7 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; MOORE, P. K. **Farmacologia**., 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012.

RAO, V. S. N.; SANTOS, F. A.; SOBREIRA, T. T.; SOUZA, M. F.; SILVEIRA, E. R. Investigations on the Gastroprotective and Antidiarrhoeal Properties of Ternatin, a Tetramethoxyflavone from *Egletes viscosa*. **Pharmacology and Molecular Biology**, v. 39, p. 603-613.2001

RIBEIRO, P. F. M.; VENTURA-ANTUNES, L.; GABI, M.; MOTA, B.; GRINBERG, L. T.; FARFEL J. M.; FERRETTI-REBUSTINI, R. L.; LEITE, R. E. P.; JACOB FILHO, W.; HERCULANO-HOUZEL, S. The human cerebral cortex is neither one nor many: Neuronal distribution reveals two quantitatively different zones in the gray matter, three in the white matter, and explains local variations in cortical folding. **Front Neuroanat**. v. 7, p. 28. 2013.

RIDET, J. L. Reactive astrocytes: cellular and molecular cues to biological function. **Trends Neurosci.**, v. 20, p. 570–577, 1997.



ROCHE, M.; DIAMOND, M.; KELLY, J. P.; FINN, D. P. In vivo modulation of LPS-induced alterations in brain and peripheral cytokines and HPA axis activity by cannabinoids. **Journal of Neuroimmunology**, v. 181, n. 1-2, p. 57-67, 2006.

RODGERS, R. J.; CAO, B. J.; DALVI, A.; HOLMES, A. Animals models of anxiety: an ethological perspective. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 30, p. 289-304, 1997.

ROMAN, S., SAVOIA, M. G. Automatic thoughts and anxiety in soccer team. **Psicologia teórica. Prática.**, v. 5, p. 13-22. 2003.

ROMEO, H. E.; TIO, D. L.; RAHMAN, S. U.; CHIAPPELLI, F.; TAYLOR, A. N. The glossopharyngeal nerve as a novel pathway in immune-to-brain communication: relevance to neuroimmune surveillance of the oral cavity. **J. Neuroimmunol.**, v. 115, p. 91– 100, 2001.

ROMERO, R.; ESPINOZA, J.; GONCALVES, L. F.; KUSANOVIC, J. P.; FRIEL, L.; HASSAN, S. The role of inflammation and infection in preterm birth. **Seminars in Reproductive Medicine**, v. 25, n. 1, p. 21-39, 2007.

SALUK-JUSZCZAK, J.; WACHOWICZ, B. The proinflammatory activity of lipopolysaccharide. **Postepy Biochemii**, v. 51, n. 3, p. 280-287, 2005.

SANTOS, R. L.; GUIMARAES, G. P.; NOBRE, M. S. C.; PORTELA, A. S. Análise sobre a fitoterapia como prática integrativa no Sistema Único de Saúde/ Analysis about phytotherapy as an integrating practice in the Brazilian Unified Health System (UHS). **Rev. bras. plantas med**; 13(4): 486-491, 2011.

SCHIEPERS, O. J.; WICHRS, M. C.; MAES, M. Cytokines and major depression. **Program Neuro-psychopharmacology**, v. 29, n. 2, p. 201-217. 2005.

SCHMIDT, M. B.; SOUZA, L. D. M.; RUSH, S. G. S. Prevalência e ansiedade associados ao transtorno de ansiedade generalizada em adolescentes. X Salão de iniciação científica, PUC-RS: 1939-1943. 2010.

SHEFFRIN, M.; DRISCOLL, H. C.; LENZE, E. J. Pilot study of augmentation with aripiprazole for incomplete response in late-life depression: getting to remission. **J. Clin. Psychiatry**; v. 70(2), p. 208-13, 2009.

SILVEIRA, E. R.; PESSOA, O. D. L. Constituintes micromoleculares de plantas do Nordeste com potencial farmacológico – com dados de RMN  $C^{13}$ . Expressão gráfica, p. 27-39. 2005.

SIMÕES, C. M. O. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. UFRGS/UFSC. 2007. 6a Edição.

SMITH, K.; LEYDEN, J. J. Safety of doxycycline and minocycline: a systematic review. **Clinical Therapeutics**. 27:1329e 42. 2005.

SOMERS, J. M.; GOLDNER, E. M.; WARAICH, P.; HSU, L. Prevalence and incidence studies of anxiety disorders: a systematic review of the literature. **J Psychiatry**. v .51(2),p. 100-113, 2006.

SONG, C.; LIN, A.; BONACCORSO, S.; HEIDE, C.; VERKERK, R.; KENIS, G.; BOSMANS, E.; SCHARPE, S.; WHELAN, A.; COSYNS, P.; JONGH, R.; MAES, M. The inflammatory response system and the availability of plasma tryptophan in patients with primary sleep disorders and major depression. **J. Affect Disord.**, v. 49, n. 3, p. 211–219, 1998.

SOUSA, F. C. F.; OLIVEIRA, I. C. M.; SILVA, M. I. G.; MELO, C. T. V.; SANTIAGO, V. R.; CHAVES, R.; VASCONCELOS, S. M. M.; MACÊDO, D. S.; FILHO, J. M. B. Involvement of monoaminergic system in the antidepressant-like effect of riparin I from *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae) in mice. **Fundamental & Clinical Pharmacology** , v. 28. 2012.

SPULBER, S.; EDOFF, K.; HONG, L.; MORISAWA, S.; SHIRAHATA, S.; CECCATELLI, S. Molecular hydrogen reduces LPS-induced neuroinflammation and promotes recovery from sickness behaviour in mice. **PLS One** 2012, v. 7, e. 42078. 2012.

STAHL, S. M. Transtornos ansiosos e ansiolíticos. In **PSICOFARMACOLOGIA: Bases Neuroquímicas e Aplicações Práticas**. 3ª . ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, Cap. 14. p. 481-519, 2010.

STERU, L.; CHERMAT, R.; THIERRY, B.; SIMON, P. Tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. **Psychopharmacology**, v. 85, p. 367-70, 1985.

STONE, E. A.; GRUNEWALD, G.L.; LIN, Y.; AHSAN, R.; ROSENGARTEN, H.; KRAMER H. K.; QUARTERMAIN, D. Role of epinephrine stimulation of CNS  $\alpha$ 1-adrenoceptors in motor activity in mice. **Synapse**; v. 49, p. 67-76, 2003.

SWIERGIEL, A. H.; SMAGIN, G. N.; JOHNSON, L. J.; DUNN, A. J. The role of cytokines in the behavioral responses to endotoxin and influenza virus infection in mice: effects of acute and chronic administration of the interleukin-1-receptor antagonist (IL-1ra). **Brain Research**, v. 776, n. 1-2, p. 96-104, 1999.

TANSEY, M. G. Neuroinflammatory mechanisms in Parkinson's disease: potential environmental triggers, pathways, and targets for early therapeutic intervention. **Exp. Neurol.**, v. 208, p. 1-25, 2007.

TAYLOR, L. The healing power of rainforest herbs. A guide to understanding and using herbal medicinals, **New York, Square One Publishers**, 2005.

TEIXEIRA, C. P. L.; MELO, C. T. V.; DE ARAUJO, F. L. O.; DE CARVALHO, A. M. R.; SILVA, M. I. G.; BARBOSA-FILHO, J. M.; MACÊDO, D. S.; VIANA, G. S. B.; SOUSA, F. C. F. Antidepressant-like effect of riparin II from *Aniba riparia* in mice: evidence for the involvement of the monoaminergic system. **Fundam Clin Pharma**. (2011), in press.

THORNICROFT, G.; MAINGAY, S. The global response to mental illness. **BMJ** 21:325(7365):608-9, 2002.

TORSSELL, K. G. B. The mevalonic acid pathway. **New York: John Wiley**, p. 189. 1983.

TREIT, D.; MENARD, J.; ROYAN, C. Anxiogenic stimuli in the elevated plus-maze, **Pharmacol. Biochem. Behav.** v. 44: 463-469, 1993.

TRIVEDI, M. H.; THASE, M. E.; OSUNTOKUN, E. An integrated analysis of olanzapine/fluoxetine combination in clinical trials of treatment-resistant depression. **J. Clin. Psychiatry**; v. 70(3), pp. 387-96, 2009.

TSUKAMOTO, T.; ASAKURA, V.; TSUNEIZUMI, V.; SATOH, V.; SHINOZUKA, V.; HASEGAWA, K. Therapeutic effects and side effects in patients with major depression treated with sulpiride once a day, **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 18, (3), p. 615–618, 1994.

TYNAN, R. J.; WEIDENHOFER, J.; HINWOOD, M.; CAIRNS, M. J.; DAY, T. A.; WALKER, F. R. A comparative examination of the anti-inflammatory effects of SSRI and SNRI antidepressants on LPS stimulated microglia. **Brain Behavior and Immunity**, 26:469e 79. 2012.

UBOGU, E. E. The expression and function of chemokines involved in CNS inflammation. **Trends Pharmacol. Sci.**, v. 27, p. 48–55, 2006.

URIBE, R. M.; LEE, S.; RIVIER, C. Endotoxin stimulates nitric oxide production in the paraventricular nucleus of the hypothalamus through nitric oxide synthase I: correlation with hypothalamic-pituitary-adrenal axis activation. **Endocrinology**. v. 140:5971e 81. 1999.

VANWEST, D.; MAES, M. Activation of the inflammatory response system: a new look at the etiopathogenesis of major depression. **Neuro Endocrinol. Lett.**, v. 20, n. 1, p. 11–17, 1999.

VASCONCELOS, A. S. ; OLIVEIRA, I. C. M.; VIDAL, L. T. M.; BARBOSA-FILHO, J. M.; VASCONCELOS, S. M. M.; FONTELES, M. M. F.; MACEDO, D. S.; SOUSA, F. C. F. Subchronic administration of riparin III induces antidepressive-like effects and increases BDNF levels in the mouse hippocampus. **Fundamental & Clinical Pharmacology** , v. 29, p. 394-403, 2015.

VELLOSA, J. C. R. et al. Alterações metabólicas e inflamatórias em condições de estresse oxidativo. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**. v. 34, n. 3, p. 305-312. 2013.

VICKERY, M. L.; VICKERY, B. Secondary Plant Metabolism. **The Macmillan Press Ltd. Hong Kong**. 1981.

VITKOVIC, L. Cytokine signals propagate through the brain. **Mol. Psychiatry**, v. 5, p. 604–615, 2000.

WATKINS, L. R. Neurocircuitry of illness-induced hyperalgesia. **Brain Res.**, v. 639, p. 283–299, 1994.

WILLNER, P. Animal models of depression: validity and application. In: GESSA, G.L. (ed). **Neurobiology Treatment**. New York: Raven Press, p. 19-41, 1995.

WILLNER, P. Dopamine and depression. In: DI CHIARA, G. (ed.), Handbook of Experimental Pharmacology: Dopamine in the CNS. **Springer**, Berlin, p. 213-234, 2002.

WONG, M. L.; LICINIO, J. Research and treatment approaches to depression. **Nat Rev Neurosci**, v. 2, p. 343–51, 2001.

XU, D. X.; CHEN, Y. H.; WANG, H.; ZHAO, L.; WANG, J. P.; WEI, W. Tumor necrosis factor alpha partially contributes to lipopolysaccharide-induced intra-uterine fetal growth restriction and skeletal development retardation in mice. **Toxicology letters**, v. 163, n. 1, p. 20-29, 2006.

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

YIRMIYA, R.; GOSHEN, I. Immune modulation of learning, memory, neural plasticity and neurogenesis. **Brain Behav. Immun.**, v. 25, p. 181–213, 2011.

YUNES, R. A.; FILHO, V. C. Breve análise histórica da química de plantas medicinais: Sua importância na atual concepção de fármaco segundo os paradigmas ocidental e oriental. **J.B. Plantas medicinais sob a ótica da Química Medicinal moderna**. Chapecó: Argos, p. 17-44. 2001.

ZANGROSSI, J. R.; HETEM, L. A. B.; GRAEFF, F. G. Modelos Animais de Ansiedade: Ansiedade e transtornos de ansiedade. **Científica Nacional**. p. 85-120. 1997.

ZHAN, J.; ZHOU, P. A. Simplified method to evaluate the acute toxicity of ricin and ricinus agglutinin. **Toxicology**, v. 186, p. 119-123, 2003.

ZHANG, D.; HU, X.; QIAN, L.; WILSON, B.; LEE, C.; FLOOD, P.; LANGENBACH, R.; HONG, J. S. Prostaglandin E2 released from activated microglia enhances astrocyte proliferation *in vitro*. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 238, n. 1, p. 64-70, 2009.

ZUNSZAIN, P. A.; HEPGUL, N.; PARIANTE, C. M. M. Inflammation and Depression. **Curr. Top. Behav. Neurosci.**, v. 14, p. 135-151, 2013.