



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
Campus DE SOBRAL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

ANNYTA FERNANDES FROTA

***Cimicifuga racemosa*: UMA NOVA PERSPECTIVA PARA O TRATAMENTO DE
DISTÚRBIOS NEUROLÓGICOS**

SOBRAL

2015

ANNYTA FERNANDES FROTA

***Cimicifuga racemosa*: UMA NOVA PERSPECTIVA PARA O TRATAMENTO DE
DISTÚRBIOS NEUROLÓGICOS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará – *Campus* de Sobral, como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

Área de concentração: Macromoléculas.

Orientadora: Profa. Dra. Lissiana Magna Vasconcelos Aguiar

Co-orientador: Prof. Dr. Rodrigo Maranguape Silva da Cunha

SOBRAL

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca do Curso de Medicina – *Campus* de Sobral

F961c Frota, Annyta Fernandes.
Cimicifuga racemosa: uma nova perspectiva para o tratamento de distúrbios neurológicos. / Annyta Fernandes Frota. – 2015.
175 f. : il. color., enc. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Curso de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Sobral, 2015.
Área de Concentração: Macromoléculas.
Orientação: Profa. Dra. Lissiana Magna Vasconcelos Aguiar.
Coorientação: Prof. Dr. Rodrigo Maranguape Silva da Cunha.

1. Ansiedade. 2. 6-hidroxiopamina. I. Título.

CDD 616.8

ANNYTA FERNANDES FROTA

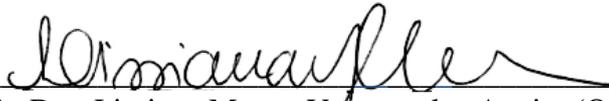
***Cimicifuga racemosa*: UMA NOVA PERSPECTIVA PARA O TRATAMENTO DE
DISTÚRBIOS NEUROLÓGICOS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará – *Campus* de Sobral, como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

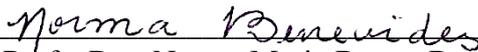
Área de concentração: Macromoléculas.

Aprovada em: 06/02/2015

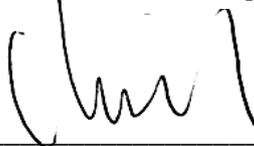
BANCA EXAMINADORA



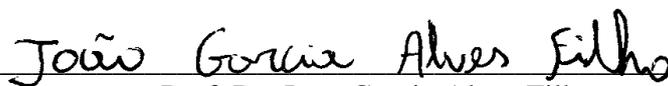
Profª. Dra. Lissiana Magna Vasconcelos Aguiar (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará – *Campus* de Sobral (UFC)



Profª. Dra. Norma Maria Barros Benevides
Universidade Federal do Ceará – *Campus* Pici - Fortaleza (UFC)



Prof. Dr. Gerardo Cristino Filho
Universidade Federal do Ceará – *Campus* de Sobral (UFC)



Prof. Dr. João Garcia Alves Filho
Universidade Estadual Vale do Acaraú (UVA)

**Aos meus pais, que muito amo e aos quais
muito devo.**

AGRADECIMENTOS

À Deus, por me proporcionar a vida, a oportunidade de sonhar e poder realizar esses sonhos, por colocar pessoas maravilhosas em meu caminho, por belas amizades pois sem elas a jornada seria mais amarga. Obrigada por tudo que és em minha vida!

À CAPES, pelo apoio financeiro à pesquisa.

À Faculdade de Medicina, pelo apoio na infraestrutura.

Ao Prof. Dr. Rodrigo Maranguape, pelo apoio desde a iniciação científica, por acreditar que seria capaz, pela Co-orientação no Mestrado e por sua amizade.

À Profa. Dra. Marlene Feliciano, pelas orientações dadas na Iniciação Científica, por ter me engajando na pesquisa.

À Profa. Dra. Lissiana Vasconcelos, pelas orientações, por acreditar e confiar, por aceitar me orientar, acima de tudo pela amizade, cuidado, carinho, por deixar participar da sua vida, por todos os momentos que vivenciamos, por toda dedicação, meu Muito Obrigada!

Ao Prof. Dr. Gerardo Cristino, pelo apoio, sempre se dispondo a atender nos pedidos de receitas e medicamentos para o tratamento dos animais.

À Profa. Dra. Silvia Costa, pela parceria feita, por ter acolhido calorosamente em seu Laboratório em Salvador e ter deixado fazer um pouco de pesquisa junto aos seus, pelos ensinamentos e a todos que fazem parte do LabNq (UFBA), em especial a Wagno Alcântara, por ter se disponibilizado a acompanhar-me durante a estadia em Salvador.

À Profa Dra. Norma Benevides, pela contribuição dada a este trabalho.

À Kátia Alves (Kate), por ter deixado participar da sua pesquisa de Mestrado, e assim, abrir as portas do Laboratório de Farmacologia, apresentando as Profas. Mirna Marques e Lissiana Vasconcelos e por toda a amizade desde a graduação.

À Emmanuelle Coelho e Alexandre Barros, por todo ensinamento e tempo dedicado a me ensinarem, por terem deixado participar da pesquisa de vocês e assim poder desenvolver a minha, seguido os passos dos Mestres. Obrigada!

Aos integrantes do Laboratório de Farmacologia, Samuel, Alice, Jordânia, Danielle, Débora, Jonas, Jonatas e Ângela, por toda atenção e ensinamentos prestados no meu primeiro ano de Mestrado, obrigada pelos ensinamentos!

Aos meus anjos que Deus enviou, Luziana Mara, Tarcizio Brito, Rayane Siqueira, Nayara Araújo, Thomas Dominik e Jéssika por toda dedicação, apoio, trabalho, amizade, pelo companheirismo, noites, feriados, finais de semana passadas no laboratório, alegria e até mesmo as discussões, momentos de descontração, enfim, obrigada por fazerem parte dessa

pesquisa, da minha vida, obrigada por cada momento proporcionado, sem vocês não teria sido possível. Muito obrigada!

Aos integrantes do Laboratório de Fisiologia e Neurociências, Francisco (FranJomes), Prof. Dr. Ronaldo Viana, Cirlânio e aos demais.

Às secretárias e amigas Edilda Albuquerque e Mary Oliveira, vocês foram parte fundamental nessa história, desde as burocracias e pendências até a amizade que se formou, me deixando vivenciar o dia-a-dia com vocês. Guardarei essa amizade para sempre!

À turma “Plus” do Mestrado, pelo apoio nas disciplinas, pelo companheirismo e por todos os momentos bons e ruins vividos nesses 2 anos.

Às minhas grandes amigas, Louricélia, Marianne, Wandy e Vitória, por toda amizade nesses longos anos de parceria, desde a faculdade até os momentos de estudos para a seleção e nos desesperos das disciplinas do mestrado. Vocês foram essenciais nessa caminhada!

Aos funcionários da Faculdade de Medicina, Sr. Almino, Sr. Araújo, vigilantes, Gade, Sr. Robério, José, pela atenção e disponibilidade.

Ao Laboratório de Genética Molecular, aos colegas João Garcia, Carlos e Rafael.

Aos animais, que sacrificaram (sem escolha), suas vidas em prol da pesquisa e da realização deste trabalho.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Aos meus pais, Nêuracir e Anto. Frota, por todo apoio, dedicação, cuidado e por sempre acreditarem e apostarem que um dia iria conseguir chegar onde sonhei, obrigada por estarem sempre presentes em minha vida, obrigada pela Vida!

Aos meus irmãos, Silvia, Frota Júnior e Francisco, por todo carinho e cuidado a mim dedicado desde a infância.

À Ricardo Basto, por toda paciência, carinho, atenção, cuidado, companheirismo, por ter sido tão presente nesses cinco anos de convivência, pelo apoio sempre, principalmente nos momentos mais difíceis, pelo auxílio dado neste trabalho. Você foi parte fundamental nessa conquista. Não teria sido capaz sem sua ajuda. Muito obrigada!

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.

(Martin Luther King)

RESUMO

O fitoterápico Aplause é um composto derivado do extrato etanólico do rizoma da planta *Cimicifuga racemosa* (Cr), comercialmente utilizado no tratamento de sintomas ocorrentes na menopausa, e cujos princípios ativos associados à bioatividade são os fitoestrógenos, predominantes neste composto. Apesar de relatos na literatura indicarem outras atividades com potencial farmacológico, os efeitos da administração crônica deste fitoterápico sobre o sistema nervoso central (SNC), ainda permanecem não esclarecidos na literatura. Por este motivo, o presente estudo investigou os possíveis efeitos neuropsicofarmacológicos e uma potencial atividade neuroprotetora de Cr em modelos *in vivo* e *in vitro*. Para este estudo, utilizou-se o fitoterápico Aplause®. Camundongos machos *Swiss* (25-30 g), tratados com Cr (1; 5; 10; 25; 50; 100 e 200 mg/Kg/21 dias/*per os*) ou salina (0,9%), foram submetidos a uma avaliação neuropsicofarmacológica preliminar, seguido pela realização de ensaios para análise de atividade locomotora, ansiolítica, anti-depressiva e de ação sedativa/hipnótico. Para a investigação do potencial neuroprotetor, utilizaram-se ratos machos Wistar (250-300 g), os quais foram submetidos ao modelo de doença de Parkinson (DP), induzido por injeção unilateral de 6-hidroxidopamina (6-OHDA) em corpo estriado e, posteriormente, seguido pelo tratamento com Cr (1,25; 2,5 e 5 mg/Kg/21 dias/*per os*) ou salina (0,9%). No 21º dia, após a indução da DP, realizaram-se os seguintes ensaios comportamentais: Campo aberto, *Rota Rod* e teste Rotacional induzido por apomorfina. Após eutanásia, áreas cerebrais (camundongos e ratos) foram dissecadas e submetidas a análises neuroquímicas e transcricionais. Adicionalmente, para análise de uma possível atividade antioxidante *in vitro*, realizaram-se ensaios para a determinação de alterações estruturais e eletroquímicas em mitocôndrias pré-incubadas em solução contendo Cr (50, 100 ou 200 µg/mL) e submetidas a estresses pró-oxidativos. De acordo com os resultados, Cr promoveu ação ansiolítica e sedativa em camundongos, com efeito dose-dependente, e com alterações transcricionais no hipocampo, similares ao antidepressivo Imipramina. Cr demonstrou atividade neuroprotetora contra alterações neurocomportamentais, neuroquímicas e transcricionais induzida por 6-OHDA, em corpo estriado de ratos. Cr apresentou atividade antioxidante nos modelos *in vivo* e *in vitro*, os quais podem estar associados aos efeitos neuroprotetores observados *in vivo*. Portanto, Cr apresenta-se como um fitoterápico com possíveis implicações neuropsicofarmacológicas e como uma potencial estratégia terapêutica contra desordens neurodegenerativas.

Palavras-chave. *Cimicifuga racemosa*, Atividade antioxidante, Ansiedade, Sedação, 6-hidroxidopamina.

ABSTRACT

Aplause's phytotherapeutic is a compound derived from ethanolic extract of the plant rhizome *Cimifuga racemosa* (Cr), commercially used for treatment of symptoms occurring at menopause. Cr shows as the main bioactives predominant the phytoestrogens. Despite reports in the literature indicate others activities with pharmacological potential, the effects of the chronic administration of this phytotherapeutic on the Central Nervous System (CNS) remain unclear. Thus, the present study investigated the possible neuropsychopharmacologic effects and a potential neuroprotective activity of Cr by *in vivo* and *in vitro* models. For this study, we used the ethanolic extract isolated from Cr present in the Aplause's phytotherapeutic. Initially, male Swiss mice (25-30 g) were chronically treated with Cr (1; 5; 10; 25; 50; 100 e 200 mg/Kg/21 days/ *per os*) or Saline (0.9%). After, animals were submitted to neuropsychopharmacological preliminary evaluation and possible physiological alterations, following by locomotor, anxiolytic, anti-depressive and hypnotic/sedative assays, respectively. To investigate the potential neuroprotective action, Wistar rats (250-300 g) were submitted to Parkinson's disease model (PD) induced by unilateral injection of 6-hydroxydopamine (6-OHDA) on striatum, following by treatment with Cr (1.25; 2.5 e 5 mg/Kg/ 21 days/ *per os*) or Saline (0.9%). At 21st day, rats were submitted to neurobehavioral assays (Open field test, Rota rod and apomorphine-induced rotational test). Then, animals were euthanized and cerebral areas were dissected and used to perform neurochemical and transcriptional analyses. In addition, to evaluate a possible antioxidant activity *in vitro*, we performed assays to determine the effect of Cr (50, 100 and 200 µg/mL) on structural and electro-chemical alterations induced by pro-oxidant agents in mitochondria. Our results shows that the treatment with Cr promotes anxiolytic and sedative effects in mice, modulation and transcriptional changes on hippocampus like Imipramine. Cr shows neuroprotective activity against neurobehavioral, neurochemical and transcriptional alterations induced by 6-OHDA into striatum from rats. Cr exhibited antioxidant activity *in vivo* and *in vitro* models used in this study, which can be associated with neuroprotective effects observed *in vivo*. Additionally, Cr shows pharmacologic safety in animal models. Therefore, Cr represents a phytotherapeutic with possible neuropsychopharmacologic implications and as a potential therapeutic strategy against neurodegenerative disorders.

Keywords. *Cimicifuga racemosa*, *Antioxidant activity*, *Anxiety*, *Sedation*, *6-hydroxydopamine*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Estruturas da Planta. <i>Cimicifuga racemosa</i> (L.) Nutt.....	26
Figura 2 -	Triterpenos e seus heterosídeos. <i>Cimicifuga racemosa</i>	29
Figura 3 -	Compostos fenólicos. <i>Cimicifuga racemosa</i>	30
Figura 4 -	Receptor GABA _A e mecanismo de ação dos benzodiazepínicos.....	35
Figura 5 -	Vias Dopaminérgicas e Serotonérgicas Relacionadas a Ansiedade e Depressão.....	37
Figura 6 -	Análise neurocomportamental.....	44
Figura 7 -	Teste de Campo Aberto em camundongos.....	45
Figura 8 -	Teste da Placa Perfurada em camundongos.....	46
Figura 9 -	Teste de Labirinto em Cruz Elevado em camundongos.....	48
Figura 10 -	Teste da Suspensão da Cauda.....	49
Figura 11 -	Teste do Nado Forçado.....	49
Figura 12 -	Sono Induzido por Pentobarbital.....	50
Figura 13 -	Ilustração da reação entre ácido tiobarbitúrico com os produtos de decomposição dos hidroperóxidos.....	52
Figura 14 -	Ilustração da Detecção da Emissão do Fluoróforo SYBRGreen® em Tempo Real por qPCR.....	54
Figura 15 -	Análise macroscópica da mucosa gástrica interna.....	58
Figura 16 -	Análise da atividade motora no Teste do Campo aberto (<i>Open Field test</i>).....	60
Figura 17 -	Teste da Placa Perfurada (<i>Hole Board test</i>).....	62
Figura 18 -	Labirinto de Cruz Elevada (<i>Plus-maze test</i>).....	63
Figura 19 -	Labirinto de Cruz Elevado (<i>Plus-maze test</i>).....	63
Figura 20 -	Teste da Suspensão da Cauda.....	65
Figura 21 -	Teste do Nado Forçado.....	65
Figura 22 -	Teste do Tempo de Sono Induzido por Pentobarbital.....	66
Figura 23 -	Análise dos Níveis de Peroxidação Lipídica (TBARS) nas Áreas Cerebrais.....	68
Figura 24 -	Análise da Curva de <i>Melting</i>	70
Figura 25 -	Análise da expressão de RNA mensageiro dos genes de controle	

	endógeno.....	71
Figura 26 -	Análise por qPCR.....	73
Figura 27 -	Via da Dopamina.....	91
Figura 28 -	Modelo de Doença de Parkinson induzido por injeção unilateral de 6-hidroxidopamina (6-OHDA).....	96
Figura 29 -	Ilustração do Modelo de Doença de Parkinson induzido por injeção unilateral de 6-hidroxidopamina (6-OHDA).....	101
Figura 30 -	Teste de Campo aberto em ratos.....	102
Figura 31 -	Teste de <i>Rota Rod</i> em ratos.....	103
Figura 32 -	Teste rotacional induzido por apomorfina.....	104
Figura 33 -	Ilustração da Reação de Griess.....	105
Figura 34 -	Ilustração da reação entre ácido tiobarbitúrico com os produtos de decomposição dos hidroperóxidos.....	106
Figura 35 -	Reação entre a glutatona reduzida e DTNB (Reagente de Ellman) para a determinação de hidroperóxidos empregando a enzima glutatona reduzida.....	107
Figura 36 -	Ilustração da reação da oxidação de <i>Amplex Red</i> , em presença de horseradish peroxidase, para o fluoróforo resorufina.....	110
Figura 37 -	Ilustração da Detecção da Emissão do Fluoróforo SYBRGreen® em Tempo Real por qPCR.....	115
Figura 38 -	Gaiola Metabólica para Ratos.....	117
Figura 39 -	Análise da atividade motora no Teste de Campo Aberto (<i>Open field test</i>).....	120
Figura 40 -	Análise da atividade relaxante muscular no Teste de <i>Rota rod</i>	122
Figura 41 -	Análise Temporal da Variação Rotacional.....	123
Figura 42 -	Análise do Comportamento Rotacional Induzido por Apomorfina.....	123
Figura 43 -	Análise da concentração de nitrito/nitrato nas áreas cerebrais.....	125
Figura 44 -	Análise da concentração de Peroxidação Lipídica (TBARS) nas áreas cerebrais.....	126
Figura 45 -	Análise dos níveis de Glutaciona Reduzida (GSH) nas áreas	

	cerebrais.....	127
Figura 46 -	Efeitos de Cr contra danos Mitocondriais induzidos por Indutores Oxidativos.....	129
Figura 47 -	Análise da Curva de <i>Melting</i>	131
Figura 48 -	Análise da expressão de RNA mensageiro dos genes de controle endógeno.....	132
Figura 49 -	Análise por qPCR.....	134
Figura 50 -	Esvaziamento gástrico e Trânsito Gastrintestinal.....	135
Figura 51 -	Análise de alterações da atividade renal e do Cólon.....	136

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Descrição dos oligonucleotídeos (primers) utilizados na reação de qPCR.....	55
Tabela 2 -	Análises neurofarmacológicas preliminares.....	57
Tabela 3 -	Análise da micção e atividade excretória após administração de Cr.....	58
Tabela 4 -	Quantificação do RNA total.....	69
Tabela 5 -	Descrição dos oligonucleotídeos (<i>primers</i>) utilizados na reação de qPCR.....	113
Tabela 6 -	Quantificação do RNA total.....	130

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

(w/v)	Massa/volume
Δ	Variação
Σ	Somatório
°C	Graus Célcius
μL	Microlitros
μM	Micromolar
μMol	Micromol
6-OHDA	6-hidroxi-dopamina
A/ABS	Absorbância
Ac-SM	23-O-Acetylshengmanol 3-O-b-D-xylopyranoside
AP	Antero-posterior
AP-1	Fator de transcrição ativador de proteína 1
ATP	Adenina trifosfatada
BDNF	Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro
BDZ	Benzodiazepínicos
BSA	Albumina soro- bovina
cDNA	DNA complementar
CE	Corpo estriado
CEPA	Comissão de Ética em Pesquisa Animal
CFP	Córtex Pré-frontal
Cm	Centímetros
Cr	<i>Cimicifuga racemosa</i>
CREB	Fator de transcrição do elemento de ligação proteico
Ct	<i>Cycle threshold</i>
D	Intestino distal
DEPC	Dietilpirocarbonato
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxiiribonucleotídeos trifosfatados
DP	Doença de Parkinson
dT	Desoxitimina
DTNB	Ácido 2-nitrobenzóico

DTT	Ditiotreitol
DZP	Diazepam
EaaT1/SLC1A3/GLAST	Transportador de Glutamato e Aspartato
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EG	Esvaziamento gástrico
EGTA	Ácido etileno glicol tetra-acético
ELISA	<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>
eNOS/NOS ₃ /Cnos	Óxido nítrico sintase endotelial
EPM	Erro padrão da média
Et	Estômago
FLU	Flumazenil
G	Gramas
GABA	Ácido γ -aminobutirico
GAPDH	Gliceraldeído 3 fosfodesidrogenase
GSH	Glutationa reduzida
GSSG	Glutationa oxidada
GSTNB	Aduto Glutationa-ácido 2-nitro-5-mercapto-benzóico
H	Hora
H ⁺	Próton de Hidrogênio
H ₃ PO ₄	Ácido fosfórico
HC	Hipocampo
HCl	Ácido clorídrico
HEPES	Ácido 2-[4-(2-hidroxietil) piperazina-1-yl]etanosulfônico
HPRT	Hipoxantina-guanina fosforibosil transferase
HRP	Horseradish peroxidase
i.p.	Intraperitoneal
IL1 β	Interleucina 1 beta
IMI	Imipramina
iNOS/NOS2	Óxido nítrico sintase induzida
ipsi	Ipsilateral
K ⁺	Íon de Potássio
KCl	Cloreto de potássio
Kg	Quilogramas

L	Médio-lateral
LCE	Labirinto em cruz elevada
M	Intestino medial
MCF-7	Linhagens de células de câncer humano
MDA	Malonildialdeído
Mg	Miligramas
Mg ²⁺	Magnésio
mGluR	Receptor glutamato metabotrópico
min	Minutos
Mix	Mistura
mM	Milimolar
MZF-1	<i>myeloid zinc finger-1</i>
N	Quantidade de animais por grupo
NaNO ₂	Nitrito de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NEBA	Número de entradas nos braços abertos
NEED	N-naftil-etilenodiamina
NFKB	Fator Nuclear <i>Kappa</i> B
Nm	Nanômetros
NMDA	N-metil D-aspartato
nNOS/NOS1	Óxido nítrico sintase neuronal
NO	Óxido nítrico
NS	Identificação do Protocolo do CEPA
OH	Hidroxila
P	Intestino Proximal
p65	Proteínas 65 (componente do fator de transcrição NFKB)
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PEBA	Porcentagem de entradas nos braços abertos
<i>Per os</i>	Via oral
PGE2	Prostaglandina da série E2
pH	Potencial Hidrogeniônico
PKA	Proteína quinase A

Ppia	Peptidilpropil isomerase A
PTBA	Porcentagem do tempo de permanência nos braços abertos
qPCR	PCR em tempo real
RNA	Ácido ribonucleico
RNA _m	RNA mensageiro
ROS	Espécies reativas de oxigênio
rpm	Rotações por minuto
S	Segundos
SBCAL	Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório
SNC	Sistema nervoso central
TBARS	Substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico
TGI	Trânsito gastrointestinal
TNB	Ácido 2-nitro-5-mercapto-benzóico
TNF	Teste do nado forçado
TNF α	Fator de necrose tumoral alfa
TPBA	Tempo de permanência nos braços abertos
TRKB	Receptor tropomiosina quinase B
TSC	Teste de suspensão da cauda
U	Unidades
UFC	Universidade Federal do Ceará
V	Vertical
VF	Vermelho de fenol
Vol	Volume
W	Watts
α -Tub	Alfa tubulina
β -Act	Beta actina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	24
1.1	Fitoterápicos	24
1.2	O Fitoterápico <i>Cimicifuga racemosa</i>	25
1.3	Atividade farmacológica evidenciada	26
1.4	Bioativos encontrados no extrato de <i>C. racemosa</i>	27
1.5	Glicosídeos triterpenos	27
1.6	Isoflavonas	30
1.7	Perspectivas Farmacológicas do Uso de <i>Cimicifuga racemosa</i>	30
	CAPÍTULO I - <i>C. racemosa</i>: Avaliação dos Efeitos Neuropsicofarmacológicos em Camundongos	32
2	INTRODUÇÃO	33
2.1	<i>As Desordens Neurocomportamentais</i>	33
2.1.1	<i>Ansiedade</i>	33
2.1.2	<i>Depressão</i>	35
2.1.3	<i>Alterações Transcricionais na Ansiedade e Depressão</i>	37
2.2	<i>Uso de Modelos Animais para a Investigação de Possíveis Alterações Neurocomportamentais induzidas por Bioativos</i>	38
2.3	<i>Potenciais Implicações Neurocomportamental de <i>Cimicifuga racemosa</i></i>	39
2.4	<i>Hipótese Científica</i>	40
3	OBJETIVOS	41
3.1	<i>Geral</i>	41
3.2	<i>Específicos</i>	41
4	MATERIAL E MÉTODOS	42
4.1	<i>Extratos de <i>Cimicifuga racemosa</i></i>	42
4.2	<i>Animais</i>	42
4.3	<i>Aspectos Éticos</i>	42
4.4	<i>Modulação Farmacológica</i>	42
4.5	<i>Preparo das drogas e vias de administração</i>	43

4.6	<i>Tratamento dos grupos experimentais</i>	43
4.7	<i>Protocolo Experimental</i>	43
4.8	<i>Análises Neurocomportamentais e Fisiológicas Preliminares</i>	44
4.9	<i>Avaliação da Atividade Locomotora</i>	45
4.9.1	<i>Teste do Campo Aberto (Open field test)</i>	45
4.10	<i>Avaliação da Atividade Ansiolítica</i>	46
4.10.1	<i>Teste da Placa Perfurada (Hole board test)</i>	46
4.10.2	<i>Teste do Labirinto em Cruz Elevado (Plus maze test)</i>	47
4.11	<i>Avaliação da Atividade Antidepressiva</i>	48
4.11.1	<i>Teste da Suspensão da Cauda</i>	48
4.11.2	<i>Teste do Nado Forçado</i>	48
4.12	<i>Avaliação da Atividade Sedativa/Hipnótica</i>	50
4.12.1	<i>Teste do Tempo de Sono Induzido por Pentobarbital</i>	50
4.13	<i>Dissecação das Áreas Cerebrais</i>	51
4.14	<i>Análises Neuroquímicas</i>	51
4.14.1	<i>Determinação da Peroxidação Lipídica (TBARS)</i>	51
4.15	<i>Determinação da expressão do RNAm de mediadores Neuroinflamatórios e BDNF através de PCR quantitativa em tempo real (qPCR)</i>	52
4.15.1	<i>Extração do RNA tota</i>	52
4.15.2	<i>Análise Quantitativa e Qualitativa do RNA total</i>	52
4.15.3	<i>Síntese de cDNA</i>	53
4.15.4	<i>Construção dos primers</i>	53
4.15.5	<i>PCR quantitativa em tempo real (qPCR)</i>	53
5	ANÁLISE ESTATÍSTICA	56
6	RESULTADOS	57
6.1	<i>Análises Neurocomportamentais e Fisiológicas Preliminares</i>	57
6.2	<i>Avaliação da Atividade Locomotora</i>	59
6.2.1	<i>Teste do Campo Aberto (Open field test)</i>	59
6.3	<i>Avaliação da Atividade Ansiolítica</i>	61
6.3.1	<i>Teste da Placa Perfurada (Hole board test)</i>	61

6.3.2	<i>Teste de Labirinto em Cruz Elevada (Plus maze test)</i>	61
6.4	<i>Avaliação da Atividade Antidepressiva</i>	64
6.4.1	<i>Teste da Suspensão da Cauda</i>	64
6.4.2	<i>Teste do Nado Forçado</i>	64
6.5	<i>Avaliação da Atividade Sedativa/Hipnótica</i>	66
6.5.1	<i>Teste do Tempo de Sono Induzido por Pentobarbital</i>	66
6.6	<i>Análises Neuroquímicas</i>	67
6.6.1	<i>Determinação da Peroxidação Lipídica (TBARS)</i>	67
6.7	<i>Determinação da expressão do RNAm de mediadores Neuroinflamatórios e BDNF através de PCR quantitativa em tempo real (qPCR)</i>	68
6.7.1	<i>Análise do RNA Total Isolado de Hipocampo de Camundongos</i>	68
6.7.2	<i>Avaliação da Especificidade dos Oligonucleotídeos (primers) utilizados através da Análise da Melting Curve</i>	70
6.7.3	<i>Análise do Genes de Controle Endógeno (Housekeepings) nas Condições de Estudo Utilizadas</i>	70
6.7.4	<i>Análise dos Efeitos de Cr na Expressão de BDNF, cFOS, cJUN, EaaT1 e TRKB-F em Hipocampo de Camundongos por qPCR</i>	71
7	DISCUSSÃO	74
8	CONCLUSÃO	87
	CAPÍTULO II - <i>C. racemosa</i>: Investigação do Efeito Neuroprotetor em Modelo Experimental de Doença de Parkinson em Ratos	88
9	INTRODUÇÃO	89
9.1	<i>Epidemiologia</i>	89
9.2	<i>Etiologia/Fisiopatologia</i>	89
9.3	<i>O Sistema Nervoso Central: importância de sua integridade funcional</i>	91
9.4	<i>Neurodegeneração</i>	92
9.4.1	<i>Neurodegeneração e a plasticidade neural</i>	93
9.4.2	<i>Envolvimento de Mediadores Pró-inflamatórios na Neurodegeneração</i>	93

9.4.3	<i>Indução Experimental de Doença de Parkinson como Modelo de Estudo de Processos de Neurodegeneração e Neuroinflamação.....</i>	95
9.5	<i>Estrogênios: molécula com potencial neuroprotetor.....</i>	96
9.6	<i>Hipótese Científica.....</i>	97
10	OBJETIVOS.....	98
10.1	<i>Geral.....</i>	98
10.2	<i>Específicos.....</i>	98
11	MATERIAIS E MÉTODOS.....	99
11.1	<i>Extratos de Cimicifuga racemosa.....</i>	99
11.2	<i>Animais.....</i>	99
11.2.1	<i>Aspectos éticos.....</i>	99
11.3	<i>Modulação Farmacológica.....</i>	100
11.4	<i>Cirurgia esterotáxica.....</i>	100
11.5	<i>Preparo da droga e via de administração.....</i>	101
11.5.1	<i>Tratamento dos grupos experimentais.....</i>	101
11.6	<i>Protocolo experimental.....</i>	102
11.7	<i>Avaliação da Atividade Locomotora.....</i>	102
11.7.1	<i>Teste do Campo Aberto.....</i>	102
11.8	<i>Avaliação da Atividade Relaxante Muscular.....</i>	103
11.8.1	<i>Teste do Rota Rod.....</i>	103
11.9	<i>Teste Rotacional.....</i>	103
11.10	<i>Dissecação das Áreas Cerebrais.....</i>	104
11.11	<i>Análises Neuroquímicas Relacionadas a Neurodegeneração.....</i>	104
11.11.1	<i>Determinação da Concentração de Nitrito/Nitrato.....</i>	104
11.11.2	<i>Determinação da Peroxidação Lipídica (TBARS).....</i>	105
11.11.3	<i>Determinação da Concentração de Glutathiona Reduzida (GSH).....</i>	106
11.12	<i>Análise de Atividade Antioxidante in vitro.....</i>	108
11.12.1	<i>Ensaio de Atividade Antioxidante em Mitocôndrias Submetidas a Estresses Oxidativos.....</i>	108
11.12.2	<i>Isolamento de Fração Mitocondrial.....</i>	108

11.12.3	<i>Inchamento Mitocondrial</i>	108
11.12.4	<i>Medidas de Potencial de Membrana Mitocondrial</i>	109
11.12.5	<i>Medida de ROS Mitocondrial</i>	110
11.13	<i>Determinação da expressão do RNAm de mediadores Neuroinflamatórios e BDNF através de PCR quantitativa em tempo real (qPCR)</i>	111
11.13.1	<i>Extração do RNA total</i>	111
11.13.2	<i>Análise Quantitativa e Qualitativa do RNA total</i>	111
11.13.3	<i>Síntese de cDNA</i>	111
11.13.4	<i>Construção dos primers</i>	112
11.13.5	<i>PCR quantitativa em tempo real (qPCR)</i>	114
11.14	<i>Esvaziamento Gástrico e Trânsito Gastrintestinal</i>	115
11.15	<i>Análise da Atividade Renal e do Cólon</i>	117
12	ANÁLISE ESTATÍSTICA	118
13	RESULTADOS	119
13.1	<i>Avaliação da Atividade Locomotora</i>	119
13.1.1	<i>Teste do Campo Aberto (Open Field test)</i>	119
13.2	<i>Avaliação da Atividade Relaxante Muscular</i>	121
13.2.1	<i>Teste do Rota Rod</i>	121
13.3	<i>Teste Rotacional</i>	121
13.4	<i>Análises Neuroquímicas Relacionadas a Neurodegeneração</i>	124
13.4.1	<i>Determinação da Concentração de Nitrito/Nitrato</i>	124
13.4.2	<i>Determinação da Peroxidação Lipídica (TBARS)</i>	124
13.4.3	<i>Determinação da Concentração de Glutathiona Reduzida (GSH)</i>	126
13.5	<i>Análise de Atividade Antioxidante in vitro</i>	128
13.5.1	<i>Ensaio de Atividade Antioxidante em Mitocôndrias Submetidas a Estresses Oxidativos</i>	128
13.6	<i>Determinação da expressão do RNAm de mediadores Neuroinflamatórios e BDNF através de PCR quantitativa em tempo real (qPCR)</i>	129
13.6.1	<i>Análise do RNA Total Isolado de Hipocampo de</i>	

	<i>Camundongos</i>	129
13.6.2	<i>Avaliação da Especificidade dos Oligonucleotídeos (primers) utilizados através da Análise da Melting Curve</i>	130
13.6.3	<i>Análise do Genes de Controle Endógeno (Housekeepings) nas Condições de Estudo Utilizadas</i>	131
13.6.4	<i>Análise dos Efeitos de CR na Expressão dos genes BDNF, IL1β, p65 e iNOS em Corpo Estriado de Ratos submetidos a Modelo de DP por qPCR</i>	133
13.7	<i>Esvaziamento Gástrico e Trânsito Gastrintestinal</i>	134
13.8	<i>Análise da Atividade Renal e do Cólon</i>	136
14	DISCUSSÃO	137
15	CONCLUSÃO	148
16	CONSIDERAÇÕES FINAIS	149
	REFERÊNCIAS	150

1 INTRODUÇÃO

1.1 Fitoterápicos

De acordo com Ferreira e colaboradores (2014), uso de fitoterápicos constitui uma forma alternativa para a terapia medicinal, a qual movimenta uma grande parcela na economia do mercado mundial em bilhões de dólares. O Brasil está entre os países com maior potencial para a produção de novas drogas fitoterápicas, devido a sua grande área territorial, enorme quantidade de espécies botânicas e de grupos de pesquisas envolvidos com a bioprospecção de novos agentes farmacológicos. Entretanto, o Brasil ainda não possui destaque na produção de fitoterápicos, ficando atrás de outros países menos desenvolvidos tecnologicamente.

Ainda segundo Ferreira e colaboradores (2014), a Organização Mundial da Saúde têm promovido o uso de terapias alternativas integradas com conhecimentos técnicos. De acordo com a mesma, 85% da população mundial usa plantas medicinais para propósitos terapêuticos. Desde a década de 80, estudos brasileiros tem tentado quantificar o uso de plantas medicinais e fitoterápicos pela população, o qual tem crescido devido ao seu baixo custo e fácil acesso. Devido a isso, o ministério da saúde (2006) estima que 25% dos lucros da indústria brasileira são obtidos pela venda de derivados de plantas, os quais, em parte, são empregados no uso fitoterápico. Parte do estímulo do uso terapêutico de fitoterápicos vêm da confirmação do efeito biológico, relatado inicialmente pelo uso tradicionalmente popular, por grupos de pesquisas.

Nos últimos 25 anos, houve um pequeno aumento na produção científica sobre fitoterápicos, incluindo no incentivo para sua utilização por profissionais de saúde, o qual contribuiu para uma socialização da investigação científica e do desenvolvimento de uma visão crítica sobre o uso da fitoterapia e plantas medicinais (ANTONIO; TESSER; MORETTI-PIRES, 2014).

Dentre esse aumento na produção científica sobre o uso de fitoterápicos na medicina, são relatados diversos estudos envolvendo a aplicação destas drogas para o tratamento de enfermidades, como: gota (LING; BOCHU, 2014), acne (AZIMI *et al.*, 2012; FISK; LEVTOV; SIVAMANI, 2014), diabetes (EL-ABHAR; HANAN; SCHAALAN, 2014), gengivite (RAO; SUBASH; KUMAR, 2012), câncer (XU *et al.*, 2009), psoríase (DENG *et al.*, 2014), epilepsia (2000), entre outros.

De acordo com Ferreira e colaboradores (2014), essas pesquisas contemplando interações farmacológicas e trabalhos multidisciplinares podem acelerar os estudos em bases

mais seguras, desde a bancada até os ensaios clínicos, os quais auxiliam na obtenção de dados para uma maior segurança farmacológica e, ocasionalmente, efeitos colaterais que podem resultar em maiores benefícios do uso de um fitoterápico para a sociedade.

1.2 O Fitoterápico Cimicifuga racemosa

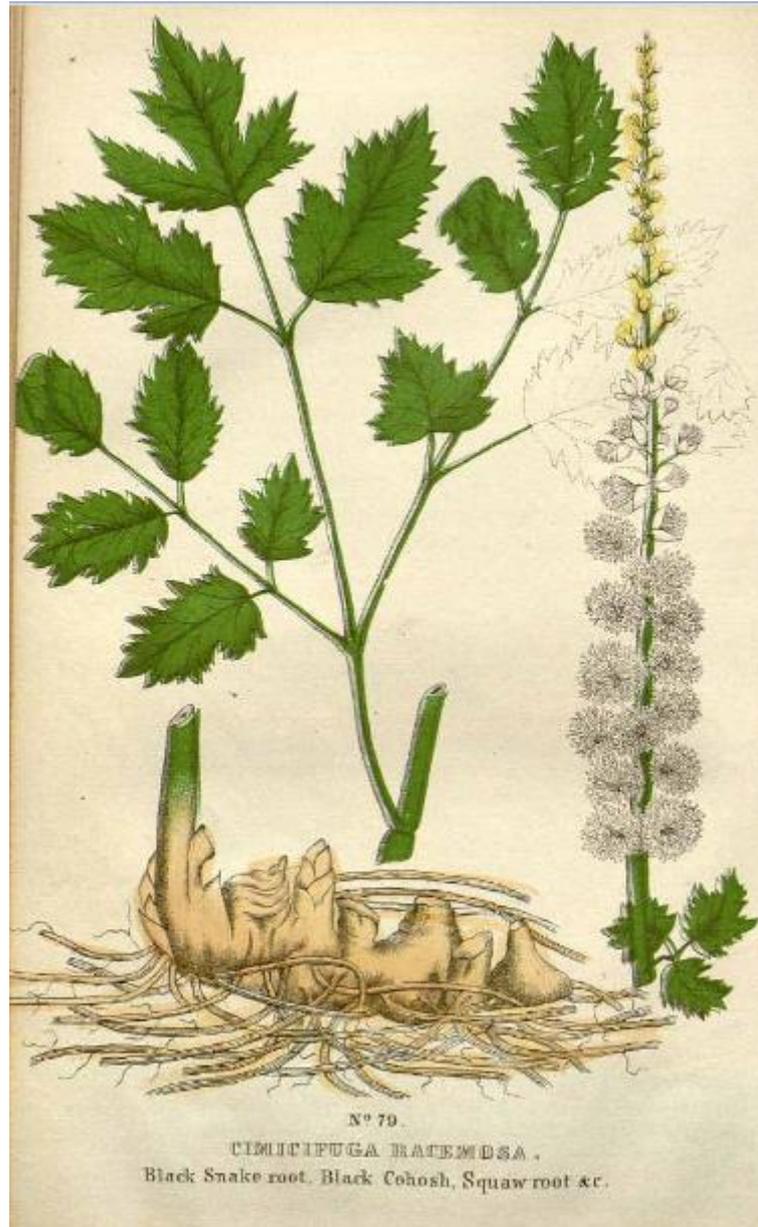
Entre os fitoterápicos atualmente comercializados no mundo e, inclusive no mercado nacional brasileiro, podemos citar a *Cimicifuga racemosa* (L) Nutt. (Cr). Cr é uma planta herbácea, pertence à família das Ranunculaceae, é nativa do leste da América do Norte, onde é conhecida como *black cohosh* (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2002; MASADA-ÁTSUMI et al., 2014), sendo denominada no Brasil como “Erva-de-São-Cristóvão” ou simplesmente de cimicífuga (Brasil, 2008; LOPES et al., 2009) (Figura 1).

Esta planta foi originalmente classificada pertencente ao gênero *Actaea* (actéia) e depois reclassificada sob o gênero *Cimicifuga*, sendo assim comumente conhecida. Porém, recentemente, a mesma foi novamente reclassificada como gênero *Actaea*, através de evidências moleculares, sendo denominada agora *Actaea racemosa* L. (SAYAKA et al., 2013; MASADA-ÁTSUMI et al., 2014).

De acordo com Wagner e Wisenauer (2006), análises históricas apontam que sua raiz era utilizada por índios para o tratamento de picadas de serpentes e também para trabalho auxiliar no parto. No final do século XIX, a planta foi utilizada para o tratamento da febre reumática. Os extratos de Cr são descritos historicamente como anti-inflamatórios, antipiréticos e analgésicos, dentre outras indicações, como no tratamento das cólicas menstruais e em sintomas da menopausa (BOLLE et al., 2007). Recentemente, o extrato de Cr passou a ser utilizado em todo mundo, mas principalmente nos Estados Unidos e na Europa, por mulheres para aliviar os sintomas do climatério (VERMES et al., 2005).

Os fitoestrogênios presentes nos rizomas possuem um leve efeito de ligação aos receptores de estrogênio. O constituinte ácido isoferúlico apresenta efeito anti-inflamatório e diminui o espasmo muscular. O ácido salicílico caracteriza as propriedades anti-inflamatórias e analgésicas da planta. Extratos padronizados (em glicosídeos triterpênicos) (KLIGLER, 2002) têm demonstrado melhorar sintomas da menopausa e pré-menopausa em estudos clínicos (KRINSKY et al., 2003).

Figura 1 - Estruturas da Planta. *Cimicifuga racemosa* (L.) Nutt.



Fonte: Good (1845)

1.3 Atividade farmacológica evidenciada

A terapia de reposição hormonal, por muito tempo foi indicada para mulheres com problemas hormonais, porém, era contra indicada para a maioria das mulheres com histórico de câncer de mama, devido a possibilidade do estrogênio estimular o crescimento das células cancerígenas (ROCK; DEMICHELE, 2003), por este motivo, muitas mulheres buscam métodos alternativos para a menopausa. E, adicionalmente, o

extrato de Cr tem demonstrado atividade inibitória na proliferação do câncer de mama (HOSTANSKA *et al.*, 2005)

A principal indicação terapêutica do extrato de *C. racemosa*, está relacionada com a eficácia no tratamento terapêutico em sintomas climatéricos (WUTTKE *et al.*, 2003; SCHELLENBERG *et al.*, 2012; MOHAMMAD-ALIZADEH-CHARANDABI *et al.*, 2013; BEER; NEFF, 2013), entre as principais ações estão a diminuição da ansiedade, depressão, cefaléia, distúrbios do sono e vertigens (BORRELI; ERNST, 2005; VERMES *et al.*, 2005).

1.4 Bioativos encontrados no extrato de *C. racemosa*

De acordo com Einbond e colaboradores (2008), o extrato de Cr possui um constituinte químico variado, sendo composto principalmente por metabólitos secundários representados por duas classes de compostos, os glicosídeos triterpenos e os fenilpropanóides. Dentre estes compostos os glicerídeos triterpenos e isoflavonóides, são classificados como fitoestrôgenos e relatados como os principais agentes farmacológicos encontrados no extrato de Cr.

1.5 Glicosídeos triterpenos

Glicosídeos são compostos, do ponto de vista químico, formados pela união de glicídeos (açúcar) e componentes “não-açúcares”, conhecidos como geninas ou agliconas. O açúcar de ocorrência mais frequente é a glicose, já as geninas podem ser constituídas dos mais distintos compostos orgânicos. São exemplos de glicosídeos os flavonóides, as antraquinonas, os cardiotônicos e as saponinas (DEWIK, 2002).

Do ponto de vista biológico, os glicosídeos desempenham um importante papel na vida dos vegetais, participando de funções reguladoras e protetoras. Por outro lado, quando inoculados no organismo humano, podem alterar funções biológicas, ora beneficiando, ora prejudicando o indivíduo. Contudo, muitos glicosídeos apresentam propriedades de interesse farmacêutico e podem ser utilizados na terapêutica, seja como adjuvantes em formulações, componentes ativos de medicamentos ou ainda, como matéria-prima para a síntese de esteroides (DEWIK, 2002; HEMEN *et al.*, 2014; PARK *et al.*, 2014).

Dentre os glicosídeos, podemos destacar o grupo das saponinas. As saponinas são detentoras de interesse farmacêutico em dois níveis. Por um lado, devido a sua atividade

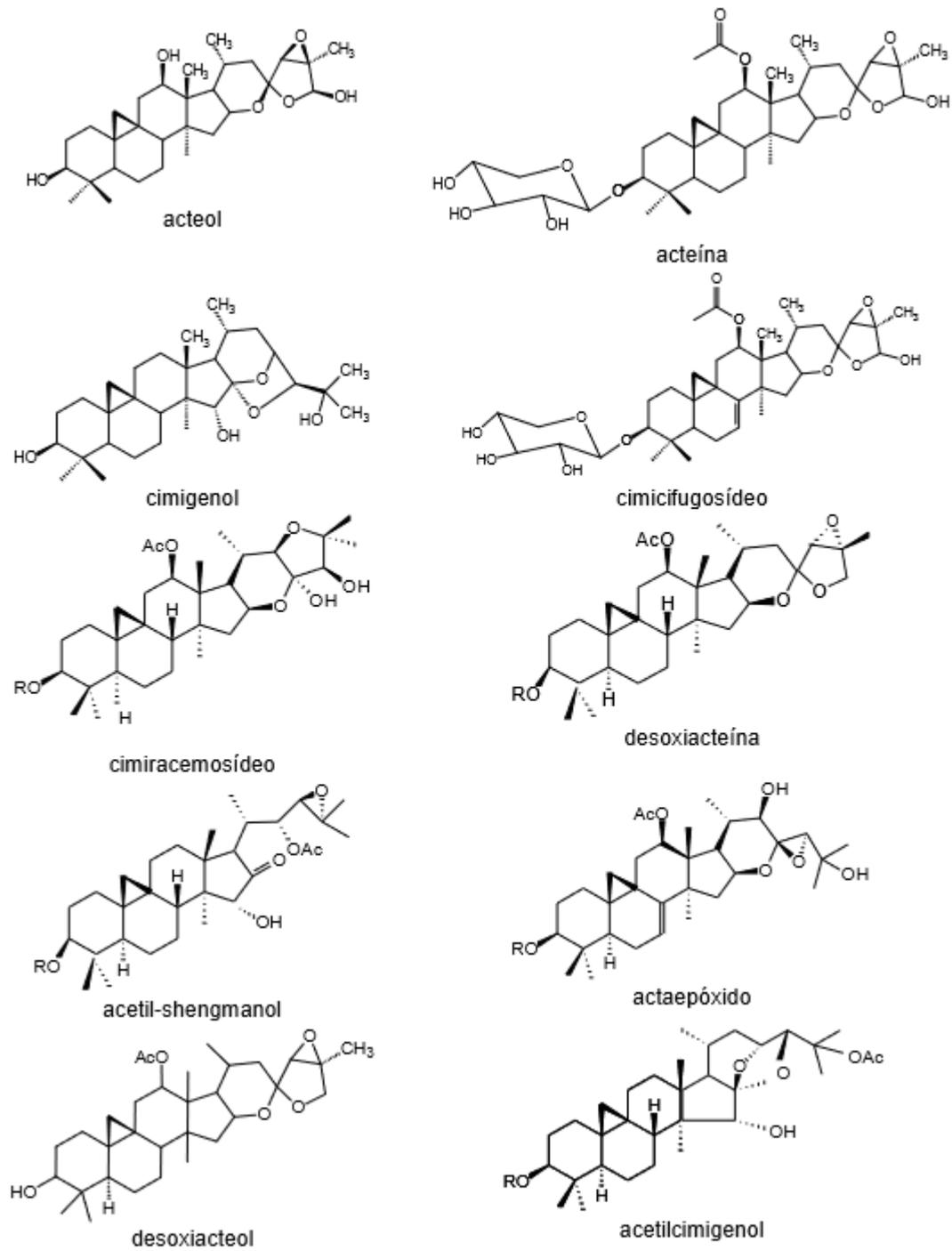
farmacológica, como antibacteriano, inseticida, fungicida, espermicidas, hepatoprotetor, ansiolítico, anti-inflamatório e antioxidante (UPADHYAY; SIGH, 2012)

Algumas saponinas apresentam atividades anti-inflamatória e antiedematogênica por diminuir a permeabilidade vascular e aumentar o tônus venoso. A propriedade anti-inflamatória deriva da inibição da liberação de histamina e da inibição da síntese de prostaglandinas. Os extratos contendo saponinas como as escinas são indicados para insuficiência veno-linfática dos membros inferiores, tanto por formulações tópicas quanto via sistêmica (SARKER; NAHAR, 2009).

Muitos dos efeitos farmacológicos atribuídos a saponinas triterpênicas estão relacionados com sua capacidade de permeabilizar membranas biológicas (atividade hemolítica). Outras atividades clínicas são relatadas como atividade antiviral, citotóxica (antitumoral), espermicida, analgésica, expectorante, antihemorroida, antiosporótica, anticancerígena e anti-inflamatória (WINK, 1990; SAMUELSSON, 1992; NESSELHUT *et al.*, 1993; ALBERTAZZI, 2002; EINBOND *et al.*, 2004).

Adicionalmente, dentre os componentes presentes no extrato de Cr, os glicosídeos triterpenos representam um dos mais abundantes, podendo compor até cerca de 27% do total de moléculas no extrato (SHAO *et al.*, 2000; EINBOND *et al.*, 2008). Entre estes, pode-se citar acteína, cimicifugose, cimiracenosídeo e derivados de desoxiacteína (BEER; NEFF, 2013) (Figura 2).

Figura 2 - Triterpenos e seus heterosídeos. *Cimicifuga racemosa*.



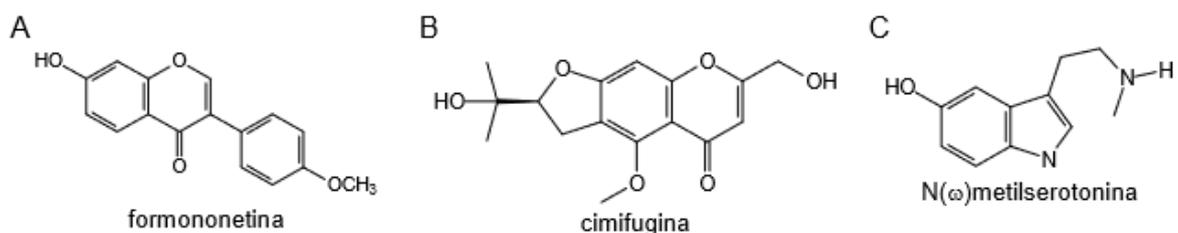
Fonte: Silva et al (2009)

1.6 Isoflavonas

Além dos glicosídeos, outro componente do extrato da *C. racemosa*, apresenta-se em grande quantidade, são os fenilpropanóides, os quais desempenham diversas funções biológicas, como proteção para a radiação ultravioleta, e contra fungos e outros micro-organismos (YU; JEZ, 2008). Dentre esta classe de moléculas, pode-se citar as isoflavonas, também conhecidas como flavonóides ou isoflavonóides, estão presentes nas plantas, sendo eles compostos químicos fenólicos. O grupo que mais se evidencia por conter este composto são as leguminosas, destacando-se a soja como principal fonte (SETCHELL; 1998) (Figura 3).

Assim como o glicosídeo triterpeno, 27-deoxiacteína, as isoflavonas também apresentam sua estrutura química similar a esteroides humanos e, portanto, podem mimetizar os efeitos desses hormônios no corpo se ligando a certos receptores de estrogênio (YU; JEZ, 2008). Assim, a literatura também relata várias atividades deste bioativo no auxílio de manifestações sintomáticas durante a menopausa (SAMMARTINO *et al.*, 2006), como atividade antioxidante, as quais apresentam benefícios a saúde, diminuindo a ação dos radicais livres (HAN *et al.*, 2002) e no auxílio do tratamento contra osteoporose (VATANPARAST; CHILIBECK, 2007).

Figura 3 - Compostos fenólicos. *Cimicifuga racemosa*.



Fonte: Silva et al., (2009). **Legenda:** (A) Isoflavona, (B) Cromona e (C) Compostos alcalóidicos.

1.7 Perspectivas Farmacológicas do Uso de *Cimicifuga racemosa*

Embora haja um consenso na literatura sobre a indicação terapêutica dos extratos de *C. racemosa* no tratamento dos desconfortos relacionados aos sintomas climatéricos, o mecanismo de ação que leva a esta indicação ainda é controverso e não está elucidado (RUHLEN; SUN; SAUTER, 2008; Silva et al., 2009).

De acordo com a literatura, estudos científicos relatam achados relacionados a ação estrogênica, de efeito dose-dependente (*WORLD HEALTH ORGANIZATION*, 2002; BECK *et al.*, 2003). Entretanto, em outros estudos, há relatos de que o extrato e/ou os princípios ativos de *C. racemosa* apresentam uma ação a nível de sistema nervoso central, em vez de ação hormonal, como mencionado anteriormente, e por este motivo, o mecanismo de ação deste fitoterápico ainda não é esclarecido (RHYU *et al.*, 2006; BEER; NEFF, 2013; STROMMER *et al.*, 2014).

Segundo o Instituto Nacional de Saúde do Departamento de Saúde e Serviços Humanos dos Estados Unidos, o uso do extrato de *C. racemosa* apresenta ação terapêutica sobre sintomas climatéricos, como sintomas vasomotores (ondas de calor e sudorese), atrofia vaginal, distúrbios do sono e labilidade emocional, por outro lado, em alguns casos são relatados efeitos adversos, como desconfortos gástricos, peso nas pernas, cefaleia e ganho de peso.

Adicionalmente, alguns mecanismos de ação envolvidos nas atividades relatadas do extrato de *C. racemosa* são descritos na literatura. Por exemplo, segundo Mahardy (2005), extratos etanólicos e isopropanólicos de *C. racemosa* foram equipotentes a ação de fármacos de ação estrogênicas e a fármacos dopaminérgicos (MAHADY, 2005). Outros estudos também relatam outras atividades farmacológicas, como atividade anti-inflamatória e espasmolítica, pela a qual o emprego da cimicífuga também tem sido associada ao tratamento de problemas reumáticos (KRINSKY *et al.*, 2003).

Apesar do exposto, a literatura ainda carece de maiores informações sobre os mecanismos envolvidos deste fitoterápico a nível de sistema nervoso central e possíveis implicações neuropsicofarmacológicas e neuroprotetoras.

CAPÍTULO I

***C. racemosa*: Avaliação dos Efeitos Neuropsicofarmacológicos em Camundongos**

2 INTRODUÇÃO

2.1 As Desordens Neurocomportamentais

Os distúrbios comportamentais, cognitivos e emocionais associados a danos ou disfunções no SNC são classificados como desordens ou transtornos neurocomportamentais (VASA; MAZUREK, 2015), os quais também estão associados a processos de degeneração neural. Entre essas desordens neurocomportamentais, podem-se citar as doenças afetivas, como a depressão e a ansiedade (JANN, 2014).

Desordens neurocomportamentais são compostas por um grande grupo de deficiências neurológicas, as quais estão associadas tanto com doenças cerebrais permanentes (esclerose múltipla, demência e condições neuro-oncológicas) como doenças cerebrais transitórias (encefalopatites metabólica e tóxica) e/ou ocasionadas por injúrias (como trauma, hipoxia e/ou esquiemia) (ZASLER; MARTELLI; JACOBS, 2013). Entre essas desordens, pode-se destacar a depressão e a ansiedade, as quais têm despertado cada vez mais o interesse científico devido ao percentual de indivíduos afetados no mundo e ao escasso conhecimento de estratégias terapêuticas eficazes e que apresentem poucos efeitos adversos (MAO et al., 2008; RABBANI; SAJJADI; MOHAMMADI, 2008).

2.1.1 Ansiedade

A ansiedade consiste em um estado de tensão ou apreensão cujas causas nem sempre são produtoras de medo, mas sim da expectativa de algo, nem sempre ruim, que acontecerá num futuro próximo. São reações normais até o momento que começam a provocar sofrimento no indivíduo (VASA; MAZUREK, 2015; LENT, 2004). Segundo a Associação Americana de Psiquiatria (DMS-IV, 2013), existem alguns tipos de ansiedade, sendo os principais transtornos:

- Agorafobia: ansiedade ou hesitação para com lugares ou situações de onde a fuga pode ser difícil ou onde o socorro pode não ser possível.
- Fobia Social: ansiedade intensa provocada pela exposição a certas situações sociais ou de desempenho.
- Fobias específicas: ansiedade intensa provocada por exposição a determinados objetos ou situações temidas.
- 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, sudoreses, tremores, falta de ar, dor no peito, 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 hesitação.

- Transtorno obsessivo-compulsivo: obsessão que pode causar intensa ansiedade ou perturbações e/ou compulsões que servem para neutralizar a ansiedade.

- Transtorno de Ansiedade de Separação: ansiedade excessiva envolvendo o afastamento de casa ou de figuras importantes de vinculação.

- Mutismo seletivo: Crianças (e adultos) com este tipo de problema são completamente capazes de falar e compreender a linguagem, mas não o fazem em determinadas situações sociais, quando é o que se espera deles.

Às vezes a ansiedade e o medo são conceituados como emoções semelhantes, porém, enquanto o medo é a resposta de uma ameaça definida, a ansiedade é fruto da incerteza. É um fenômeno emocional comum e útil aos seres humanos, sem o qual estaríamos vulneráveis aos perigos e ao desconhecido, funcionando como valor adaptativo frente às alterações do meio ambiente que nos cerca (PASQUINI; BERARDELLI; BIONDI, 2014).

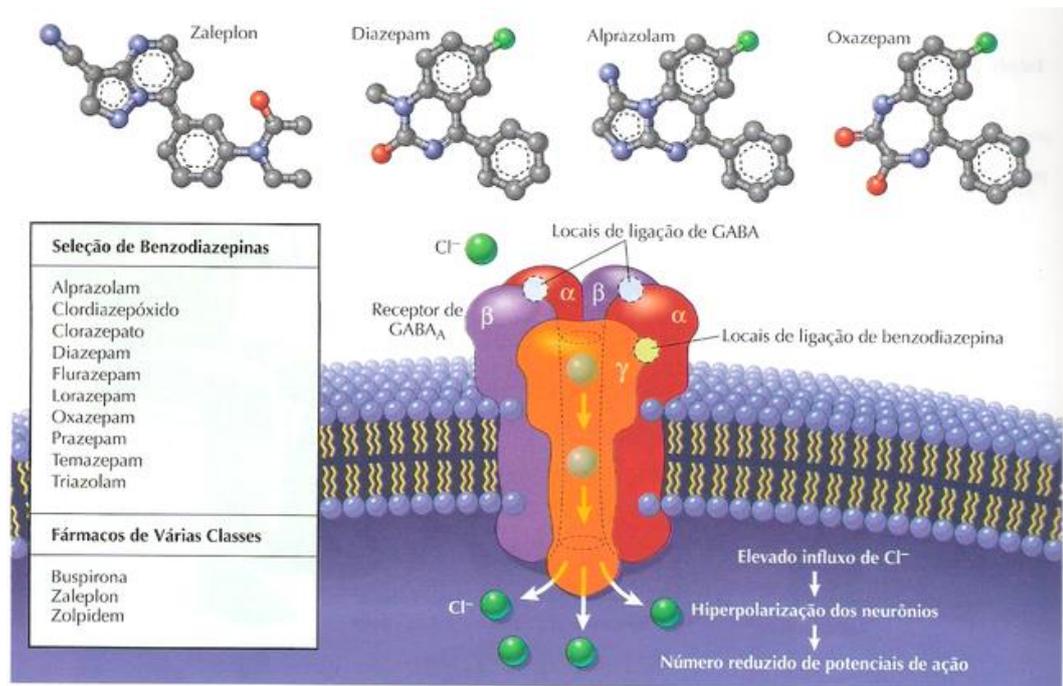
O transtorno de ansiedade está entre os mais enfrentados no século 21, e notadamente reduz a qualidade de vida e causa inúmeras perdas financeiras. De acordo com a Organização Mundial da Saúde, aproximadamente 450 milhões de pessoas em todo o mundo sofrem de algum tipo de transtorno mental comportamental (BRASIL, 2011a).

Os transtornos de ansiedade possuem uma base neural semelhante, às vezes, podem ser explicados como resultado de uma redução na sinalização inibitória mediada pelo ácido γ -aminobutírico (GABA) (JANHSEN; ROSER; HOFFMANN, 2015). O GABA é o principal neurotransmissor inibitório do Sistema Nervoso Central (SNC) e um grande número de agentes ansiolíticos possuem seu mecanismo de ação relacionado com a ação agonista de receptores GABAérgicos (CHRISTMAS; HOOD; NUTT, 2008) (Figura 4). Dentre estes ansiolíticos, a classe de benzodiazepínicos (BDZ), são os fármacos mais utilizados desde a introdução do primeiro BDZ na clínica médica em 1961 (JANHSEN; ROSER; HOFFMANN, 2015).

Nos últimos 45 anos, o tratamento farmacológico dos transtornos de ansiedade tem utilizado extensivamente os benzodiazepínicos, classe de drogas que modulam alostericamente os receptores GABAérgicos do tipo A (OLSON, 2002). No entanto, os seus efeitos adversos são predominantes, incluindo sedação, relaxamento muscular, amnésia anterógrada e

dependência física (KRALL et al., 2015). Portanto, a busca de novos bioativos que modulem distúrbios neurocomportamentais, com menos efeitos adversos, têm levantado o interesse farmacológico para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas e para elucidação desses distúrbios neurológicos.

Figura 4 - Receptor GABA_A e mecanismo de ação dos benzodiazepínicos.



Fonte: Netterimages

2.1.2 Depressão

A depressão é uma distúrbio neurocomportamental difícil de ser conceituada, pois ao mesmo tempo em que pode se referir a um conjunto de sinais e sintomas, formando uma constelação patológica, também pode corresponder a um simples sentimento normal e comum ou tratar-se de uma manifestação, assim como a dor e a angústia, que podem estar presentes em vários outros quadros clínicos, sem necessariamente configurar uma classe de psicopatologia. Os principais sintomas apresentados pela depressão incluem: apatia, irritabilidade, dificuldade de concentração, anormalidades no apetite e sono (PASQUINI; BERARDELLI; BIONDI, 2014).

A Organização Mundial de Saúde avalia que no ano de 2020, a depressão será a segunda maior causa de incapacidade e inatividade em países desenvolvidos e em desenvolvimento (KIM

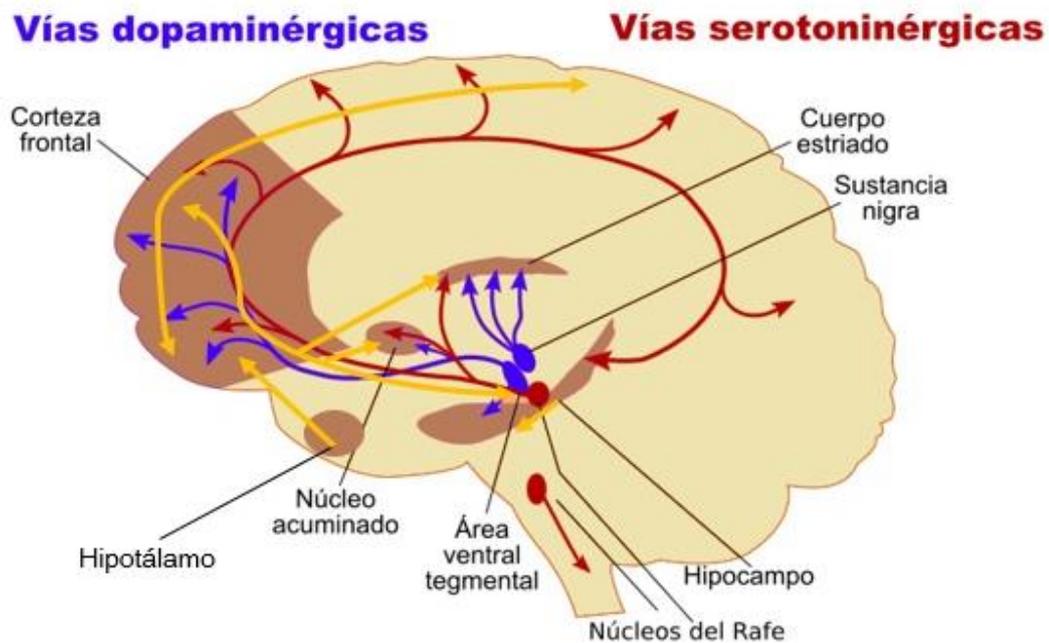
et al., 2007; MAO et al., 2008). Portanto, a depressão pode ser considerada um grave problema de saúde mental encontrado em todo o mundo e têm sido foco de pesquisas para o esclarecimento da fisiopatologia da doença.

A depressão maior é umas das formas mais comuns da doença e pode levar à perda da independência funcional. Os maiores comprometimentos físicos, social e funcional são vistos em idosos, os quais, afetam a sua qualidade de vida. A idade está dentro de um dos fatores de risco para depressão, visto que, com o avançar da idade, aumenta-se o risco de desenvolver doenças mentais, comprometendo também a capacidade funcional do indivíduo (PASQUINI; BERARDELLI; BIONDI, 2014).

A etiologia da depressão está relacionada com inúmeros fatores que podem abranger aspectos biológicos, socioeconômicos, doenças crônicas, gravidez, pós-parto e mudança de ambiente, onde episódios depressivos podem ocorrer após um período estressante ou de perda, e estes fatores podem ser agravados caso haja uma predisposição genética (RIHMER; GONDA; DÖME, 2014).

Na depressão a dopamina, serotonina, e outros neurotransmissores, como noradrenalina, ácido gama-aminobutírico e acetilcolina sofrem alterações quando há uma desordem no estado de humor, emoção, capacidade mental e o bem estar geral do organismo. Sobre a via dopaminérgica, sabe-se que a via que está mais relacionada ao comportamento é a via mesolímbica-mesocortical, sendo, portanto, a mais importante na depressão (GRAEFF, et al., 2001) (Figura 5).

Figura 5 - Vias Dopaminérgicas e Serotonérgicas Relacionadas a Ansiedade e Depressão.



Fonte: XL Sistemas S.A.

2.1.3 Alterações Transcricionais na Ansiedade e Depressão

Os distúrbios neurológicos, como a ansiedade e a depressão envolvem alterações em diversos níveis, como nas atividades neurocomportamentais e neuroquímicas relatadas anteriormente. Dentre esses níveis de alterações, podemos citar as alterações transcricionais, as quais envolvem a modulação positiva ou negativa de determinados genes-chaves no controle da homeostase do sistema nervoso central (MEDEIROS; REIS; MELLO, 2005). Dentre estes genes, envolvidos nos referidos distúrbios neurológicos, podemos citar o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), o receptor tropomiosina quinase B (TRKB), o Transportador de Glutamato e Aspartato (EaaT1) e os fatores de transcrição c-FOS e c-JUN (SEMBA et al., 1993; AUTRY; MONTEGGIA, 2012; GONZÁLEZ, 2014).

De acordo com Autry e Monteggia (2012) o BDNF é um dos genes relacionados com a neuroplasticidade, apresentado como principal função a regulação no crescimento, diferenciação e sobrevivência de células no SNC. A literatura aponta que este gene apresenta alterações em sua expressão gênica e proteica associada a problemas de estresse e depressão em pacientes com desordens neurológicas (AUTRY; MONTEGGIA, 2012).

Associado ao BDNF, o seu principal receptor, denominado de TRKB, também está associado a diferenciação e sobrevivência de células neuronais (NAKAGAWA et al., 1995; SUZUKI et al., 2002; RIVERA et al., 2002). Assim como o BDNF, o TRKB tem mostrado alterações durante eventos de distúrbios neurológicos, principalmente na ansiedade (MOU; HELDT; RESSLER, 2010; PORSCHER et al., 2011; GONZÁLEZ, 2014).

Outro gene associado a distúrbios de ansiedade é o EaaT1. Este gene está envolvido na produção de transportador de aminoácidos excitatórios, como o glutamato, para a produção de glutamina (LEHRE et al., 1995; KANAI; HEDIGER, 2004). De acordo com a literatura, alterações na via do glutamato-glutamina podem estar envolvidos na manifestação da ansiedade e um dos biomarcadores de alterações nesta via é o EaaT1 (KARLSSON et al., 2009; LEE et al., 2013).

No controle da regulação da expressão dos genes estão os fatores de transcrição, proteínas específicas que se ligam a um ou mais promotores gênicos para permitir a sua transcrição pela RNA polimerase. Dentre os fatores de transcrição citados em eventos genômicos de distúrbios de ansiedade e da depressão podemos citar o cJUN e o cFOS (SEMBA et al., 1993; KUNG et al., 2010; PERSSON et al., 2014). Os dois, cJUN e o cFOS, podem se associar para constituir o fator de transcrição ativador de proteína 1 (AP-1) que, por sua vez, está relacionada na regulação de diversos genes relacionados ao estresse, bem como a depressão (WILKINSON et al., 2009; BRAND et al., 2010; MUKHERJEE et al., 2014).

Assim, todos os genes citados, BDNF, TRKB, EaaT1, c-FOS e c-JUN, são investigados em eventos de ansiedade e depressão, e utilizados como marcadores biológicos de alterações transcricionais sugestivas de atividades relacionadas ao estresse e a condições de desordens neurológicas (AUTRY; MONTEGGIA, 2012; LEE et al., 2013; PERSSON et al., 2014; GONZÁLEZ, 2014; MUKHERJEE et al., 2014).

2.2 Uso de Modelos Animais para a Investigação de Possíveis Alterações Neurocomportamentais induzidas por Bioativos

Apesar de algumas limitações entre a aplicabilidade de processos neurais em desordens neuropsiquiátricas e descobertas de novas drogas, múltiplos ensaios neurocomportamentais têm sido utilizados por décadas para se compreender sobre as bases neurais do comportamento (GERLAI, 2002; WAHSTEN et al., 2003).

O uso de modelos animais permite uma investigação científica do comportamento de processos e mecanismos fisiopatológico envolvidos no controle de comportamentos normais e anormais (RODGERS et al., 1997; OVERMIER, 1999; PETTERS; SOMMER, 2000; PHILLIPS et al., 2002; HOLMES, 2003; MATTHEWS et al., 2005; RAND, 2008). Por este motivo, modelos animais de avaliação de alterações neurocomportamentais são importantes em todas as áreas de pesquisas biomédicas.

Os testes de análises neurocomportamentais podem avaliar uma variedade de aspectos, incluindo funções autonômicas, neuromusculares, sensitivas e excitatórias (MOSER, 2001).

Os modelos animais de avaliação neurocomportamental têm sido caracterizados em três classes: modelos animais de desordens clínicas, bioensaios comportamentais e teste de *screening* comportamentais (WILNER, 1991). Entre eles, o *screening* neurocomportamental tem sido utilizado para avaliar o impacto de manipulações genéticas e/ou farmacológicas em comportamentos específicos, os quais estão envolvidos em distúrbios comportamentais de interesse, como a ansiedade e a depressão (TECOTT; NESTLER, 2004).

2.3 Potenciais Implicações Neurocomportamental de Cimicifuga racemosa (L.) Nutt.

As plantas medicinais podem se tornar fonte de moléculas inovadoras com mecanismos de ação diferenciados, dos quais pode-se ter a melhor relação risco/benefício dos atuais fármacos disponíveis no mercado. A diversidade estrutural encontrada na natureza é fundamental na pesquisa para atingir diferentes alvos biológicos (YUNES; FILHO, 2001; AKRAM et al., 2014).

Muitos fármacos comercializados apresentam estruturas químicas relacionadas a uma molécula extraída de alguma espécie botânica de uso consagrado na medicina popular. O interesse em medicamentos derivados de plantas superiores aumentou expressivamente na última década. Estimativas atuais evidenciam que mais de 80% da população dos países em desenvolvimento dependem da medicina popular ou de medicamentos à base de plantas como fonte primária de cuidados à saúde (BRASIL, 2011b). Entretanto, a despeito dessa observação, muitas das espécies de plantas usadas pelas comunidades ainda não foram objeto de estudos de toxicidade e eficácia. Muitas espécies são usadas empiricamente, sem respaldo científico, o que demonstra que, apesar da enorme biodiversidade, existe uma lacuna entre a oferta de plantas e sua real capacidade terapêutica. Como qualquer outro medicamento, aqueles de origem vegetal ou seja, os fitoterápicos ou fitomedicamentos, devem ter a sua eficácia e segurança comprovadas, bem como a reprodutibilidade de sua ação (AKRAM et al., 2014). Nesse

contexto, a importância da investigação de plantas medicinais reside principalmente na identificação de protótipos, cuja atividade farmacológica permita o desenvolvimento de novos fármacos eficazes e seguros.

Diante desse cenário, muitas têm sido as iniciativas do Ministério da Saúde, em parceria com órgãos do governo e sociedade civil, para a utilização sustentável da biodiversidade brasileira, fazendo parte da Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos do Ministério da Saúde, representando a opção mais viável para a inovação na indústria farmacêutica nacional (Ministério da Saúde, 2006). Para isso são realizadas pesquisas que comprovem as atividades farmacológicas e/ou toxicológicas desses produtos naturais (AL-ASMARI et al., 2014).

Dentre os fitoterápicos descritos na literatura, a *Cimicifuga racemosa* (Cr) apresenta um grande potencial para aplicações farmacológicas, como para o tratamento de dores e inflamações associados a reumatismos e doenças do sistema nervoso; os quais foram introduzidos na comunidade médica desde 1844 pelo Dr. John King, e posteriormente, outros médicos americanos abriram mais o campo de ação da Cr no século XIX para o tratamento de endometriose, amenorréia, dismenorrea, esterilidade, dor severa pós-parto e para aumentar a produção de leite na mulher (MAHADY, 2005). Cr apresenta três atividades importantes sob o ponto de vista farmacológico: hipotensora, reguladora hormonal durante o climatério e anti-inflamatória (MAHADY, 2005).

De acordo com o exposto, o presente estudo objetivou investigar os efeitos, ainda não esclarecidos na literatura, de um fitoterápico *Cimicifuga racemosa* em atividades neuropsicofarmacológicas.

2.4 Hipótese Científica

Devido a relatos na literatura indicarem que algumas atividades biológicas de *Cimicifuga racemosa* podem estar relacionadas a sua ação a nível de sistema nervoso central, o presente estudo hipotetizou que o referido fitoterápico poderia apresentar efeitos neurocomportamentais, neuroquímicos e na regulação transcricional de manifestações envolvidas na resposta para ansiedade, depressão e sedação em camundongos.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar os efeitos do extrato etanólico do rizoma de *Cimicifuga racemosa* na psicofarmacologia em camundongos.

3.2 Específicos

- Identificar os possíveis efeitos neurocomportamentais de *C. racemosa* em camundongos;
- Avaliar possíveis alterações fisiológicas indicativas de toxicidade em camundongos;
- Investigar a interferência de *C. racemosa* na atividade locomotora espontânea de camundongos;
- Analisar os efeitos de *C. racemosa* em camundongos submetidos a modelos comportamentais de ansiedade (placa perfurada, labirinto em cruz elevada) e depressão (nado forçado e suspensão da cauda);
- Verificar atividade sedativa/hipnótica de *C. racemosa* pelo teste de sono induzido por Pentobarbital em camundongos;
- Determinar o perfil de expressão dos genes BDNF, TRKB, Eaat1, cFos e cJun por qPCR.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Extratos de *Cimicifuga racemosa*

O extrato da planta é do tipo etanólico, extraído do rizoma, foi adquirido em forma de comprimidos revestidos, comercializados pelo laboratório Marjan Farma, com nome comercial Aplause®.

4.2 Animais

Os animais utilizados nesse estudo foram, camundongos *Swiss (Mus musculus albinus)*, adultos, machos, com peso entre 25-30 g, todos provenientes do Biotério Setorial do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará (UFC) – *Campus Fortaleza*, os mesmos foram conduzidos ao Biotério da Faculdade de Medicina da UFC – *Campus Sobral*. Os animais foram mantidos em caixas de prolipropileno com no máximo 6 animais, em condições de biotério com temperatura constante (24 ± 1 °C), com ciclo de claro/escuro de 12 horas, recebendo ração padrão e água a vontade.

4.3 Aspectos Éticos

Os protocolos experimentais foram elaborados de acordo com o “Guia para Cuidados e Uso de Animais de Laboratório” da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL). Todos os esforços foram feitos para minimizar o número e os sofrimentos dos animais.

O protocolo experimental foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa Animal (CEPA) da UFC sob protocolo NS 23 e os experimentos realizados de acordo com as normas internacionais de uso animais em experimentação.

4.4 Modulação Farmacológica

As doses utilizadas no presente estudo foram de acordo com os dados da literatura (WINTERHOFF et al., 2003), e tomando como base a dose indicada na bula do fitoterápico, que por sua vez foi convertida para dose animal, baseado nos cálculos para determinar a dose

inicial em seres humanos, sem extrapolar para animais a partir da normalização da área de superfície corporal (BSA).

4.5 Preparo das drogas e vias de administração

O comprimido Cr foi triturado com auxílio de almofariz e pistilo e dissolvido em 3% de Tween 80 e diluído em solução salina (0,9%). Foram utilizadas sete doses de Cr: 1; 5; 10; 25; 50; 100 e 200 mg/Kg, por via oral (*per os*), as doses foram administradas por via oral (*per os*) através de uma sonda gástrica. Os grupos controles receberam veículo (solução salina emulsificada com 3% de Tween 80). As demais drogas utilizadas nos experimentos tais como Diazepam (1; 2 e 3 mg/Kg), Imipramina (10 e 30 mg/Kg), Flumazenil (2,5 mg/Kg) e Pentobarbital Sódico (50 mg/Kg), foram dissolvidas e diluídas diretamente em água destilada e administradas por via intraperitoneal.

4.6 Tratamento dos grupos experimentais

Os animais foram tratados com Cr, de forma aguda, nas doses de 1; 5; 10; 25; 50; 100 e 200 mg/Kg por via oral, durante 21 dias. Durante todo o período de tratamento os animais foram pesados diariamente e a alimentação e água foram removidas 1 hora antes da administração da droga e recolocadas depois de decorrido 1 hora da gavagem. O volume administrado foi referente ao peso de cada animal. Os testes foram realizados 1 hora após o tratamento com Cr (*per os*) e 30 minutos após o tratamento com as demais drogas por via intraperitoneal (i.p.).

Para avaliação da atividade antidepressiva foi utilizado, Imipramina (IMI) 10 e 30 mg/Kg (i.p.), nos testes de Nado Forçado e Suspensão da Causa, respectivamente, como padrões positivos. Diazepam (DZP), na dose de 1 mg/Kg (i.p.) foi utilizado como padrão positivo para os testes de Placa Perfurada e Labirinto em Cruz Elevado, na dose de Diazepam 2 mg/Kg (i.p.) para o teste de Campo Aberto, e 3 mg/Kg (i.p.) para o modelo de Tempo de Sono induzido por Pentobarbital (50 mg/Kg; i.p.), como padrão para atividade sedativa/hipnótica. O Flumazenil (FLU) (2,5 mg/Kg; i.p.) foi utilizado para avaliação do sistema GABAérgico.

4.7 Protocolo Experimental

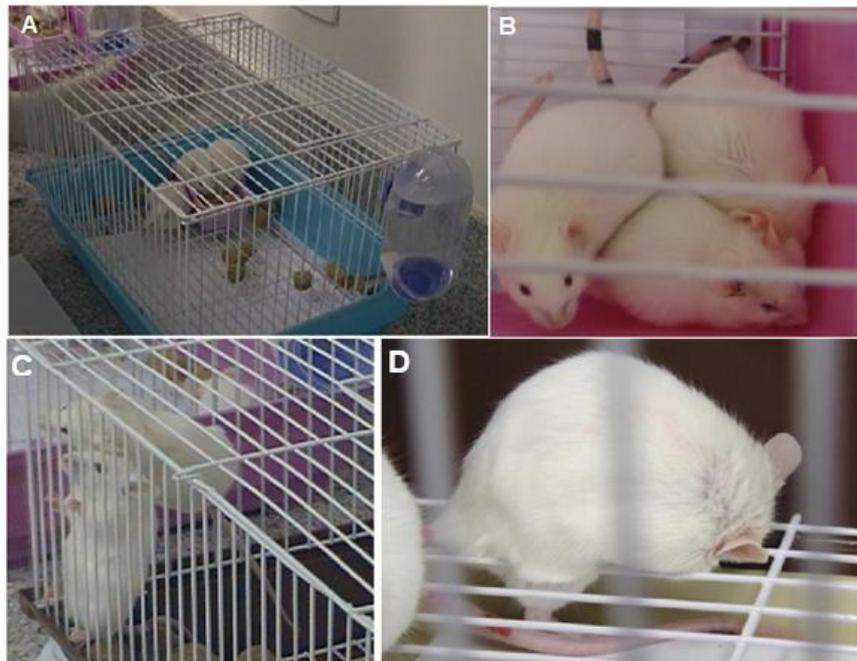
Os experimentos foram realizados durante o dia em dias distintos, onde os animais foram observados em um ambiente fechado, desprovido de barulhos externos e com

temperatura constante ($24 \pm 1^\circ\text{C}$). Para o teste de campo aberto e labirinto de cruz elevado, foi utilizado uma iluminação de baixa densidade (luz vermelha de 15 W). Os demais ensaios foram realizados com iluminação normal. Em todos os testes com exceção da suspensão da cauda e nado forçado, após a observação de cada animal foi utilizado álcool 10% para a remoção de resíduos deixados pelo animal.

4.8 Análises Neurocomportamentais e Fisiológicas Preliminares

Os animais foram divididos aleatoriamente em quatro grupos ($n=3$ *per* grupo), os quais foram tratados uma única vez com Cr (1; 10 e 100 mg/Kg, *per os*) ou veículo (salina 0,9%, *per os*) e alocados em gaiolas para observações de possíveis alterações neurocomportamentais (Figura 6) e fisiológicas (atividade renal e do cólon) nos períodos de 0-5, 15 e 30 minutos, e 1, 2, 4 e 24 horas após a administração, de acordo como descrito por Carlini (1972). Após 24 horas, os animais foram sacrificados e, em seguida, estômago, fígado, rins e coração foram removidos para análises. Os parâmetros analisados nos órgãos foram presença de danos na mucosa gástrica interna e alterações na massa úmida.

Figura 6 - Análise neurocomportamental.



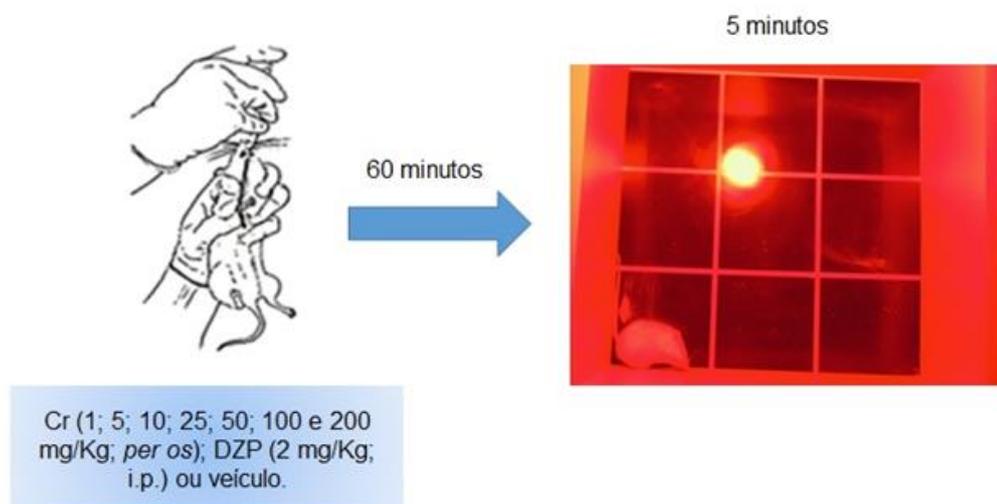
Fonte: Arquivo Pessoal da Autora. **Legenda:** Após a administração de Cr (1,0; 10 ou 100 mg/Kg; v.o.), os camundongos foram colocados em gaiolas apropriadas (A) e observados quanto a parâmetros neurocomportamentais e fisiológicos, segundo Carline e colaboradores (1972), como permanência nos cantos (B), Escalar (C), Sonolência (D) entre outros, por um período de: 0-5 min; 30 min; 1 h; 2 h; 4 h e 24 h.

4.9 Avaliação da Atividade Locomotora

4.9.1 Teste do Campo Aberto (*Open field test*)

Este teste, é baseado na metodologia descrita por Sielgel (1946) e validada por Archer (1973), foi utilizado para analisar a atividade exploratória do animal. Os parâmetros avaliados foram: número de cruzamentos com as quatro patas (movimentação espontânea), número de levantamentos sob as patas traseiras (*rearing*) e número de comportamentos de auto-limpeza (*grooming*), adicionalmente o tempo que os animais permaneceram parados, registrados no tempo de 5 minutos. Após 1 hora do tratamento por via oral os animais foram submetidos ao campo aberto (Figura 7) para avaliação dos parâmetros comportamentais. Além dos grupos tratados com Cr (1; 5; 10; 25; 50; 100 e 200 mg/Kg; *per os*) e veículo (Salina 0,9% *per os*), um grupo foi tratado com DZP (2 mg/Kg; i.p.) como controle positivo.

Figura 7 - Teste de Campo Aberto em camundongos.



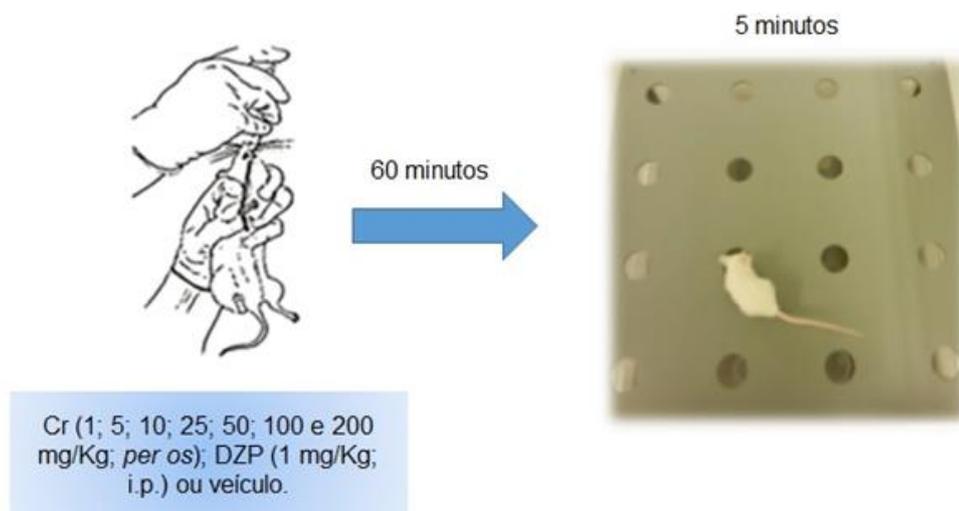
Fonte: Arquivo Pessoal da Autora. **Legenda:** Ilustração do teste campo aberto utilizado para avaliar a atividade locomotora.

4.10 Avaliação da Atividade Ansiolítica

4.10.1 Teste da Placa Perfurada (*Hole board test*)

O teste da Placa Perfurada é utilizado para determinar a ação de bioativos no comportamento exploratório e, em especial no aprendizado. O aparato utilizado consiste em uma plataforma plana com orifícios, pelos os quais os camundongos podem colocar suas cabeças afim de explorar o ambiente (CLARK et al., 1971). Através da análise da quantidade de vezes do animal em colocar a cabeça nos orifícios, bem como pelo tempo de permanência da mesma, é possível avaliar drogas quanto a possíveis efeitos psicotrópicos (DHARA et al., 2002). Deste modo, buscou-se utilizar o teste da Placa Perfurada para avaliar os efeitos de Cr na atividade exploratória de camundongos. Após 1 hora do tratamento por via oral os animais foram submetidos a placa perfurada (Figura 8) para avaliação dos parâmetros comportamentais (*head dips*). Além dos grupos tratados com Cr e veículo, um grupo foi tratado com DZP (1 mg/Kg; i.p.) como controle positivo. Cada animal foi analisado no referido teste durante 5 min.

Figura 8 - Teste da Placa Perfurada em camundongos.



Fonte: Arquivo Pessoal da Autora. **Legenda:** Ilustração do teste da placa perfurada, para avaliar a atividade exploratória.

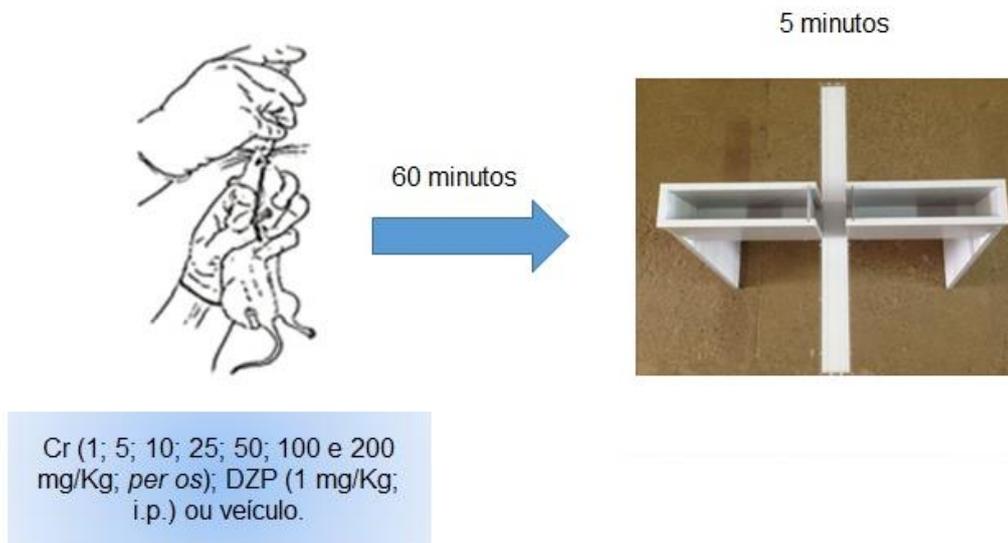
4.10.2 Teste de Labirinto em Cruz Elevado (*Plus maze test*)

O teste do Labirinto em Cruz Elevado, foi aperfeiçoado por Pellow e colaboradores (1985) e, adaptado para camundongos por Lister (1987), é utilizado como ensaio comportamental para avaliar possíveis efeitos ansiolíticos de agentes farmacológicos, bem como para auxiliar na determinação de regiões cerebrais e mecanismos envolvidos no comportamento relacionado com a ansiedade. O animal é colocado no centro da junção de quatro braços elevados a 45 centímetros do chão, consistindo de dois braços abertos (30 x 5 cm) (sem paredes, deixando os animais expostos ao meio) e dois fechados (30 x 5 x 25 cm) (com paredes, servindo com um abrigo seguro para o animal) perpendiculares (Figura 9), os quais são quantificados o percentual relativo ao número de entradas do animal em cada braço (WALF; FRYE, 2007).

Compostos ansiolíticos reduzem a aversão do animal aos braços abertos e promovem uma exploração no referido braço. Por outro lado, as passagens forçadas ou voluntárias do animal para os braços fechados estão associadas com mudanças hormonais e comportamentais indicativas de aumento da ansiedade (HOGG, 1996).

Após decorrido 1 hora do tratamento por via oral os animais foram submetidos ao labirinto em cruz elevado para avaliação dos parâmetros comportamentais (percentagem do número de entradas e do tempo de permanência nos braços abertos e fechados). Além dos grupos tratados com Cr e veículo, um grupo foi tratado com DZP (1 mg/Kg; i.p.) como controle positivo. Para a investigação do mecanismo de ação ansiolítico, foi utilizado o Flumazenil (2,5 mg/Kg; i.p.), um antagonista do receptor GABA_A/Benzodiazepínico, administrado 15 min antes do tratamento com Cr (100 ou 200 mg/Kg; *per os*), ou veículo ou DZP (1 mg/Kg; i.p.). Cada animal foi analisado no referido teste por um período de 5 min.

Figura 9 - Teste de Labirinto em Cruz Elevado em camundongos.



Fonte: Arquivo Pessoal da Autora. **Legenda:** Ilustração do teste de Labirinto em Cruz Elevado, para avaliar a ação ansiolítica de drogas em camundongos.

4.11 Avaliação da Atividade Antidepressiva

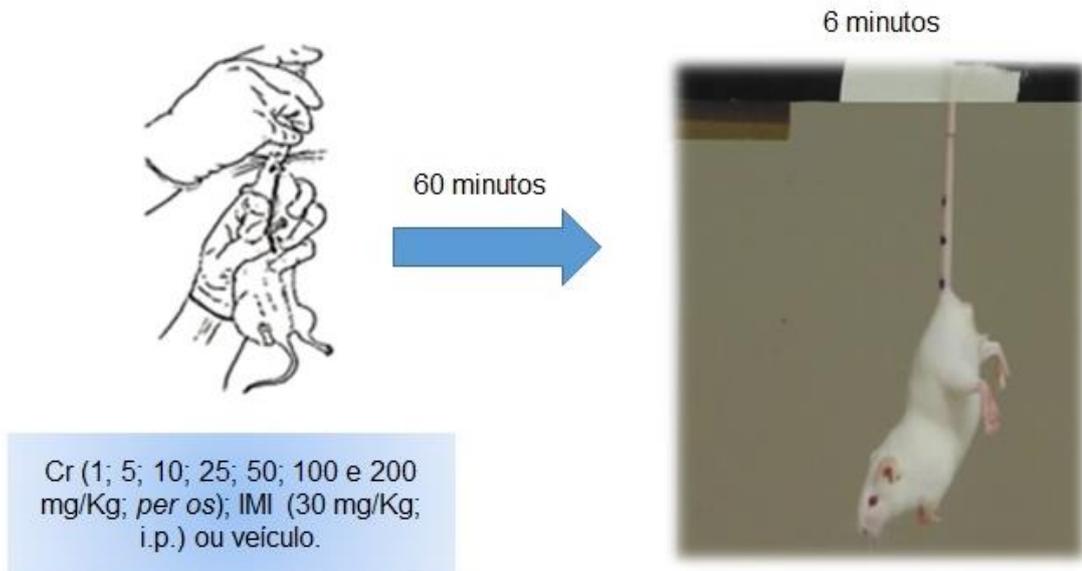
4.11.1 Teste da Suspensão da Cauda

É um teste utilizado para avaliar os efeitos antidepressivos de uma droga. Os animais devem ser suspensos, presos cerca de 1 cm a partir da ponta cauda, por uma fita adesiva numa plataforma a 58 cm da bancada do experimento (Figura 10). A duração da imobilidade deve ser feita durante 6 minutos segundo a metodologia descrita por Steru et al., (1985). Imipramina (30 mg/Kg; i.p.) foi utilizada como droga-padrão para a confiabilidade do teste.

4.11.2 Teste do Nado Forçado

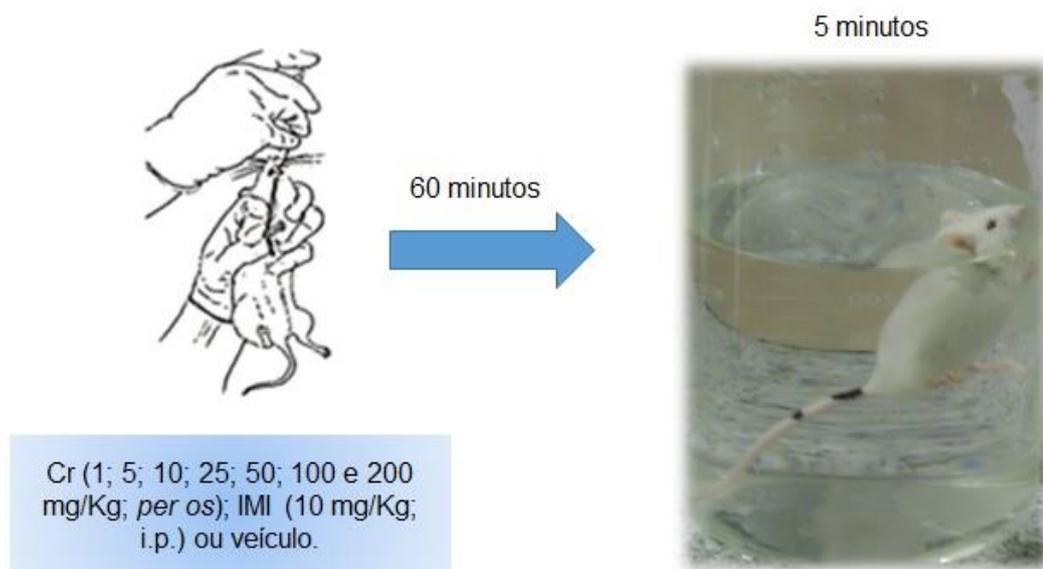
O experimento consiste na exposição do animal a um tanque (22 cm de diâmetro por 40 cm de altura) com água (25 °C) até a metade, cerca de 20 cm, por 5 minutos (Figura 11). Este teste consiste em avaliar uma possível atividade antidepressiva induzida por drogas, seguindo a metodologia descrita por Porsolt et al. (1978), onde será avaliado a duração da imobilidade durante o período de 5 minutos. Imipramina (10 mg/Kg; i.p.) foi utilizada como um antidepressivo padrão para controle experimental.

Figura 10 - Teste da Suspensão da Cauda.



Fonte: Arquivo Pessoal da Autora. **Legenda:** Ilustração do teste da suspensão da cauda, para avaliar a ação antidepressiva de drogas em camundongos.

Figura 11 - Teste do Nado Forçado.



Fonte: Arquivo Pessoal da Autora. **Legenda:** Ilustração do teste do nado forçado, para avaliar a ação antidepressiva de drogas em camundongos.

4.12 Avaliação da Atividade Sedativa/Hipnótica

4.12.1 Teste do Tempo de Sono Induzido por Pentobarbital

Após 1 hora da administração de Cr (50; 100 e 200 mg/Kg; *per os*), os animais receberam Pentobarbital Sódico (50 mg/Kg; i.p.), como agente indutor do sono. O tempo desde a injeção de Pentobarbital até a perda total do reflexo postural foi registrado como tempo de latência de sono, e o tempo de latência entre a perda e a recuperação voluntária do reflexo postural foi registrado como tempo de sono (WAMBEBE, 1985; ROLLAND et al., 1991).

Iniciado o período de sono, os animais foram posicionados em decúbito dorsal em local adequado para observação (Figura 12). Foi registrado o início do sono para cada animal. Os animais foram observados durante todo o período de sono, sendo o final deste marcado no momento em que o animal retornou à situação de alerta, caracterizada pela alteração da posição de decúbito dorsal. O período total de observação foi de no máximo 240 minutos. Diazepam (3 mg/Kg; i.p.) foi utilizado como droga-padrão.

Figura 12 - Sono Induzido por Pentobarbital.



Fonte: Arquivo Pessoal da Autora. **Legenda:** Ilustração do teste do sono induzido por Pentobarbital, para avaliar a ação sedativa/hipnótica de drogas em camundongos. Após a administração de Cr (50; 100 e 200 mg/Kg; *per os*) ou DZP (3 mg/Kg i.p) com Pentobarbital (50 mg/kg i.p). Os animais foram observados por 240 minutos ou até saírem da posição decúbito dorsal.

4.13 Dissecação das Áreas Cerebrais

No 21º dia os animais foram devidamente sacrificados e, logo em seguida, os encéfalos foram retirados rapidamente e colocados sobre papel alumínio numa placa de Petri com gelo. Em seguida o hipocampo (HC), o corpo estriado (caudado, putâmen e globo pálido) (CE) e o córtex pré-frontal (CFP), foram isolados das estruturas circunjacentes por divulsionamento. Após a dissecação, cada área foi colocada em papel alumínio sobre gelo, pesada e armazenada a -20 °C.

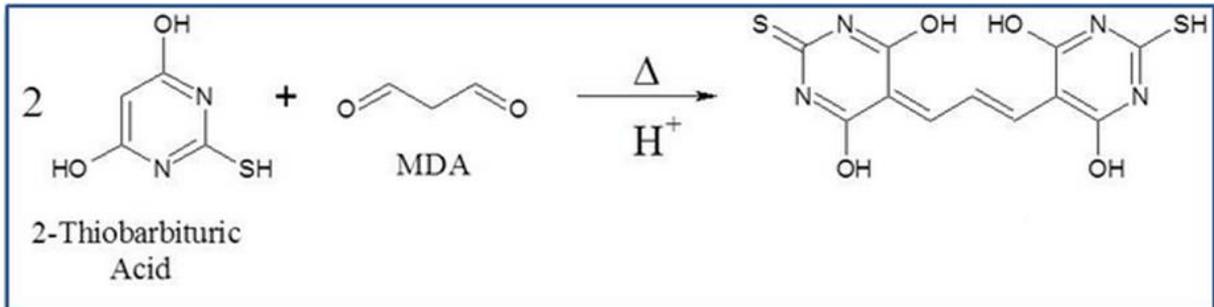
4.14 Análises Neuroquímicas

4.14.1 Determinação da Peroxidação Lipídica (TBARS)

Teste baseado na reação do ácido tiobarbitúrico com os produtos de decomposição dos hidroperóxidos. Um dos principais produtos formados no processo oxidativo é o malonildialdeído (Figura 13).

O grau de lipoperoxidação em corpo estriado de ratos foi medido através da determinação das concentrações de substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS), conforme o método de Draper e Hadley (1990). Foram preparados homogenatos da área cerebral a 10% em solução fosfato de potássio 150 mM, pH 7,4. Um volume de 0,25 mL do homogeneizado foi levado ao banho maria 37 °C por 1 hora e precipitado com 400 µL de ácido perclórico 35% e após centrifugação (14000 g por 15 min à 4°C), o sobrenadante foi transferido e a ele acrescido 200 µL de solução de ácido tiobarbitúrico 1,2% e levado ao banho de água fervente (95-100 °C/30 min). O conteúdo de TBARS foi determinado em espectrofotômetro a 532 nm. Os resultados foram expressos em micromol de malonildialdeído (MDA) por mg de tecido.

Figura 13 - Ilustração da reação entre ácido tiobarbitúrico com os produtos de decomposição dos hidroperóxidos.



Fonte: Eagle Biosciences

4.15 Determinação da expressão do RNAm de mediadores Neuroinflamatórios e BDNF através de PCR quantitativa em tempo real (qPCR)

4.15.1 Extração do RNA total

Para a extração de RNA total, utilizaram-se apenas o hipocampo dos animais. O RNA total foi extraído utilizando TRIzol® (Life Technologies/Invitrogen), seguindo as orientações do fabricante baseado no método de isolamento de RNA num único passo desenvolvido por Chomczynski e Sacchi (1987). Para isso, a referida área cerebral foi colocada em homogeneizador manual em presença de 1 mL do reagente TRIzol®. Posteriormente o RNA total foi purificado pelo método guanidino-isotiocianato-fenol-clorofórmio e, após posterior precipitação com uso de iso-propanol (isopropanol ou 2-propanol) e etanol 75 % (diluído com água tratada com DEPC), o RNA total foi mantido ($-80\text{ }^{\circ}\text{C}$) em água ultra pura tratada com DEPC.

4.15.2 Análise Quantitativa e Qualitativa do RNA total

Para testar a eficácia da extração e pureza do RNA total, foi determinada a concentração de RNA total nas amostras por diluição do RNA (fator de diluição conhecido), em espectrofotômetro no comprimento de onda de 260 nm (A_{260}) e 260/280 nm (A_{260}/A_{280}). A qualidade do RNA total foi verificada por eletroforese em gel de agarose 1,2 %, corado com brometo de etídio (10 mg/mL) e visualizado em um equipamento de luz ultravioleta.

4.15.3 Síntese de cDNA

Para a síntese de cDNA (DNA complementar) foi utilizado por reação 1 µg de RNA total, 0,3 µg do *primer* oligo (dT) (Invitrogen), 1 µL de dNTPs Mix 10 mM (Invitrogen) e água mili-q estéril, que, após misturadas, foram aquecidas a 65 °C por 5 min e depois resfriados em gelo. Posteriormente, foi adicionado 1 µL da *Superscript III reverse transcript* 10000 U (Invitrogen) (200U), 2 µL de DTT 0,1 M, 4 µL de *Fist-Strind Buffer* 5X (Invitrogen), e a mistura foi incubada no termociclador a 25 °C por 5 min, 50 °C por 60 min, sendo depois aquecido a 70 °C por 15 min e posteriormente armazenado a -20 °C.

4.15.4 Construção dos primers

Os *primers* foram desenhados de acordo com Cunha (2010), e com exceção do BDNF e HPRT, foram com base em dados obtidos do *Gene Bank* (NCBI), sob junções éxon-éxon (excetuando-se cJUN e pPIA), e submetidos à análise através do programa *PrimerBlast* (ROSEN; SKALETSKY, 2000), com especificidade somente para RNAm de *Mus musculus*. Todos foram sintetizados pela Invitrogen (Tabela 1).

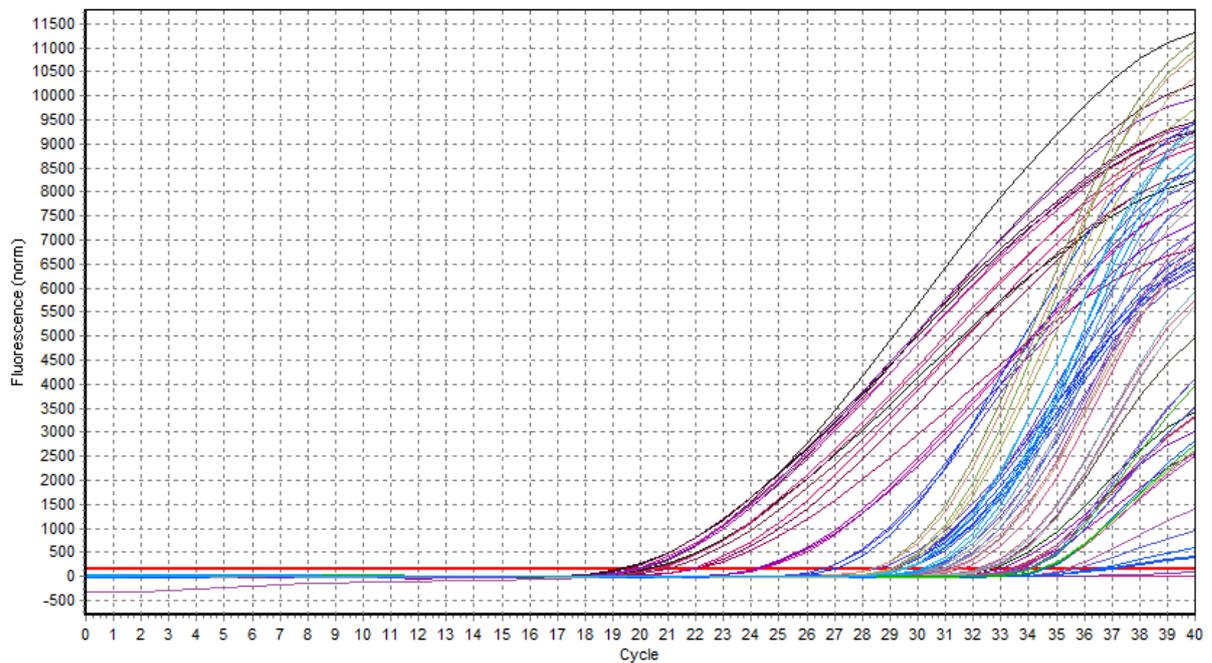
4.15.5 PCR quantitativa em tempo real (qPCR)

As análises quantitativas da expressão dos genes foram realizadas através de PCR em Tempo Real (qPCR). Para tanto, 0,1 µg do cDNA de cada amostra foi utilizado na reação de qPCR. Além dos ácidos nucleicos, a reação foi composta de iniciadores específicos (300 nm cada) e 10 µL de *2X Power SYBR Green Master Mix* (*Applied Biosystems*), com volume final de 20 µL. A reação de amplificação foi realizada no termociclador *Mastercycler® ep realplex⁴* (Eppendorf) consistindo de desnaturação inicial de 95 °C/10 min seguido de 40 ciclos térmicos de 95 °C por 15 s, 55 °C por 15 s e 60 °C por 20 s. Para análise de prováveis contaminantes foi realizada detecção da presença de produtos (*amplicons*) inespecíficos por análise da curva de *Melting*, constando de temperatura inicial de 55 °C/15 s, seguido por gradiente de 20 min e temperatura final de 95 °C/15 s. Para as análises da expressão dos genes, a amplificação das sequências alvos foram detectadas em tempo real pela emissão de fluoróforos, a qual foi captada pela unidade óptica do aparelho (Figura 14).

As análises dos dados de fluorescência obtidos foram realizadas pelo *Realplex Software 2.2* ®. Todas as reações, tanto dos genes alvo quanto dos controles endógenos, foram

realizadas em triplicatas. Os *Cycle threshold* – Ct, utilizados para a normalização de dados e para as análises, foram a média aritmética entre as triplicatas dos genes alvo e controles endógenos. A obtenção da expressão relativa foi realizada pelo método descrito por Livak e Schmittgen (2001), adaptada por Esteves e colaboradores (2013). Para a normalização, foi utilizada a equação $\Delta Ct = Ct(\text{gene alvo}) - Ct(\text{controle endógeno})$. A calibração foi determinada pela fórmula: $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct(\text{amostra}) - \Delta Ct(\text{calibrador})$. A quantificação relativa (valores arbitrários – ESTEVES et al., 2013) foi obtida pela fórmula $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ (LIVAK; SCMITTGEN, 2001 adaptada por ESTEVES et al., 2013). Utilizou-se o grupo Salina como calibrador. A expressão dos genes constitutivos HPRT e pPIA foram utilizados como controle endógeno para a normalização dos referidos dados.

Figura 14 - Ilustração da Detecção da Emissão do Fluoróforo SYBRGreen® em Tempo Real por qPCR.



Fonte: Imagem do *Realplex Software 2.2* © do arquivo pessoal da Autora.

Tabela 1 - Descrição dos oligonucleotídeos (primers) utilizados na reação de qPCR.

Nome	Sigla	Sequência	Número de Acesso / Fonte	Tamanho do amplicon (pb)	Junção éxon-éxon (pb)
Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro	BDNF IX	F 5'-CAGGTGAGAAGAGTGATGACC-3' R 5'-ATTCACGCTCTCCAGAGTCCC -3'	CARDWELL et al., 2008	nd	nd
Receptor Tropomiosina Quinase B	TRKB	F 5'-CATGAAAGGCCAGCTTCGGTCA-3' R 5'-GTCGGGACCGCCCTCCGAAG -3'	NM_001025074.1/ NCBI	109	F 1918/1919
Fator de Transcrição cFOS	cFOS	F 5'-AGACCAGAGCGCCCCATCCT -3' R 5'-GGAGATAGCTGCTCTACTTTGCCCC -3'	NM_010234.2/ NCBI	136	R 532/533
Fator de Transcrição cJUN	cJUN	F 5'-CAGGAGAGCGCTCAGGCAGACA -3' R 5'-CAGGAGAGCGCTCAGGCAGACA -3'	NM_010591.2/ NCBI	121	-
Transportador de Aminoácidos Excitatórios	EaaT1	F 5'-CTCGTCACAGGAATGGCGGCC -3' R 5'-TGCCCTTCCGGGGTGGATGA -3'	NM_148938.3/ NCBI	142	F 885/886
Hipoxantina-Guanina Fosforibosil Transferase	HPRT	F 5'-AAGACTTGCTCGAGATGTCATGAA -3' R 5'-ATCCAGCAGGTCAGCAAAGAA -3'	CARDWELL et al., 2008	nd	nd
Peptidilpropil Isomerase A	pPIA	F 5'- TTCGAGAAGGTGAAAGAAGGC-3' R 5'- ACAGAAGGAATGGTTTGTATGGG -3'	XM_913899.3 / NCBI	158	-

Fonte: Cunha (2010) e Núcleo de Biotecnologia de Sobral. **Legenda:** Nd: não definido pelo autor.

5 Análise Estatística

Todos os valores numéricos foram apresentados como erro padrão da média (EPM) e submetidos a análises de diferenças estatísticas. No caso de dados paramétricos, utilizou-se a análise de variância (*one-way* ANOVA), seguido pelo teste de Comparações Múltiplas de Bonferroni, e, no caso de dados não-paramétricos, utilizou-se o teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Comparações Múltiplas de Dunn. Consideraram-se os valores com $P < 0,05$ como estatisticamente significativos. As análises estatísticas foram realizadas no programa GraphPad Prism, versão 4.0, (San Diego, CA, EUA). Adicionalmente, todos os experimentos foram realizados por observadores “cegos”.

6 RESULTADOS

6.1 Análises Neurocomportamentais e Fisiológicas Preliminares

De acordo com as avaliações preliminares, os resultados sugerem que Cr, nas doses 1,0; 10,0 e 100,0 mg/Kg, apresentam efeitos similares. Cr demonstrou efeitos indicativos de ação no sistema nervoso central, tais como: piloereção, tremor, ptose palpebral, grooming e sonolência; e também no sistema nervoso autônomo, com animais apresentando redução do tônus muscular, em relação ao grupo controle tratado com salina, como mostra a tabela 2.

Não foram identificadas nenhuma alteração fisiológica significativa, em relação a atividade renal (micção) e do cólon (defecação), bem como nas massas úmidas dos órgãos analisados (fígado e rins), quando comparado ao grupo controle (Tabela 3). Adicionalmente, a análise macroscópica da mucosa interna gástrica (Figura 15) de animais tratados com Cr (1,0; 10,0 e 100,0 mg/Kg) por via oral não indicaram sinais de danos, em relação ao grupo Controle

Tabela 2 - Análises neurofarmacológicas preliminares.

Grupo	Efeitos comportamentais observados
Salina (<i>per os</i>)	Sem alterações comportamentais significativas observadas.
1 mg/Kg (<i>per os</i>)	Piloereção; diminuição da atividade motora de 30 min a 4 h (em relação ao grupo Salina); permanência nos cantos a partir dos 15 min, após administração; tremor na 1ª e 24ª h; ptose semi-parcial e total a partir da 1ª h; <i>grooming</i> excessivo no 15º min; redução do tônus muscular na 24ªh.
10 mg/Kg (<i>per os</i>)	Diminuição da atividade motora da 1ª a 4ª h (em relação ao grupo Controle); permanência nos cantos durante todo o tempo observado; tremor na 4ª h; ptose semi-parcial ou parcial nos primeiros 5 min e partir da 2ª h; redução do tônus muscular de 15 min a 2 h, após administração; <i>grooming</i> excessivo e sonolência na 4ª h e e sonolência na 4ª h; redução do tônus muscular e da capacidade de agarrar.
100 mg/Kg (<i>per os</i>)	Piloereção no 30º min e a partir da 2ª h; diminuição da atividade motora (em relação ao grupo Salina); permanência nos cantos; tremor após administração até o 30º min; ptose semi-parcial e parcial durante todo o período observado; sonolência da 1ª a 2ª h e <i>grooming</i> excessivo na 4ª h; maior redução do tônus muscular e da capacidade de agarrar, em relação as outras doses

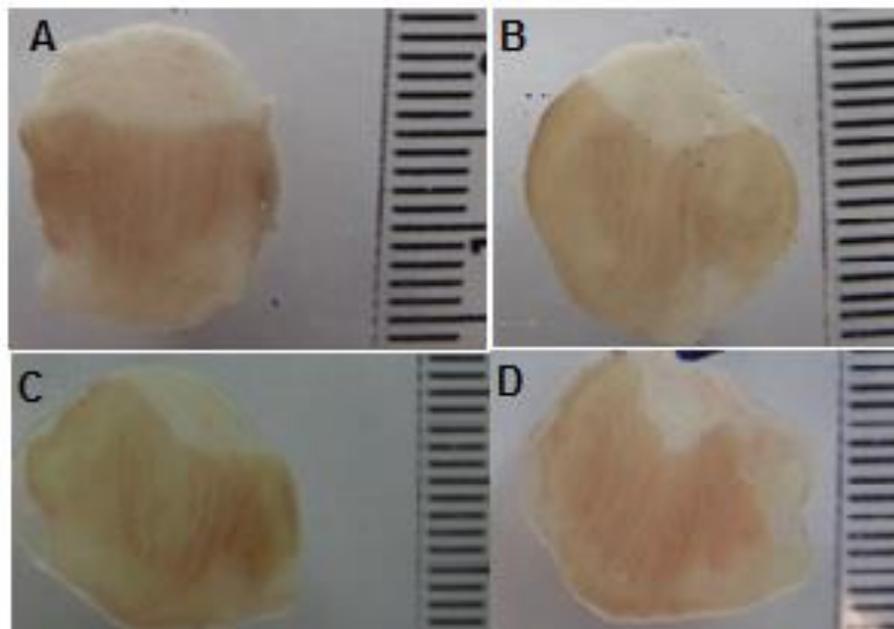
Fonte: Arquivo Pessoal da Autora. **Legenda:** Os camundongos (n = 3 por grupo, machos, pesando aproximadamente 35-40 g) foram tratados com Cr (1; 10 e 100 mg/Kg; *per os*). Observou-se parâmetros neucomportamentais segundo Carlini (1972), durante os primeiros 5 min, e, posteriormente, nos tempos 15, 30, 60 min e 2, 4 e 24 h.

Tabela 3 - Análise da micção e atividade excretória após administração de Cr.

Grupo	Via de administração	Micção (Número de vezes) média ± EPM	Defecação (Número de bolos fecais) média ± EPM	Fígado (massa úmida - g) média ± EPM	Rins (massa úmida - g) média ± EPM	Coração (massa úmida - g) média ± EPM
Salina	(<i>per os</i>)	1,143 ± 0,67	28,29 ± 23,4	1,48 ± 0,02	0,64 ± 0,02	0,28 ± 0,03
CR 1 mg/kg	(<i>per os</i>)	0,429 ± 0,30	27,00 ± 21,9	1,47 ± 0,04	0,61 ± 0,00	0,26 ± 0,04
CR 10 mg/kg	(<i>per os</i>)	0,571 ± 0,37	36,29 ± 29,9	1,42 ± 0,10	0,61 ± 0,01	0,28 ± 0,04
CR 100 mg/kg	(<i>per os</i>)	1,000 ± 0,53	25,43 ± 21,3	1,46 ± 0,10	0,62 ± 0,00	0,28 ± 0,04

Fonte: Arquivo Pessoal da Autora. **Legenda:** Os camundongos (n = 3 por grupo, machos, pesando aproximadamente 35-40 g) foram tratados com Cr (1,0; 10,0; e 100 mg/Kg; *per os*). Foram contabilizados os bolos fecais e sinais de micção segundo Carlini (1972), durante os primeiros 5 min, e, posteriormente, nos tempos 15, 30, 60 min e 2, 4 h. Adicionalmente, foram contabilizadas a micção em 24 h.

Figura 15 - Análise macroscópica da mucosa gástrica interna.



Fonte: Arquivo Pessoal da Autora. **Legenda:** (A) Controle e (B, C e D) Cr 1,0; 10,0 e 100,0 mg/Kg, respectivamente. Os camundongos (n = 3 por grupo, machos, pesando aproximadamente 35-40 g) foram tratados com Cr (1,0; 10,0 e 100,0 mg/Kg; *per os*). Após 24 h, decorrido as análises comportamentais, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e estômagos foram removidos, abertos e fotografados para análise.

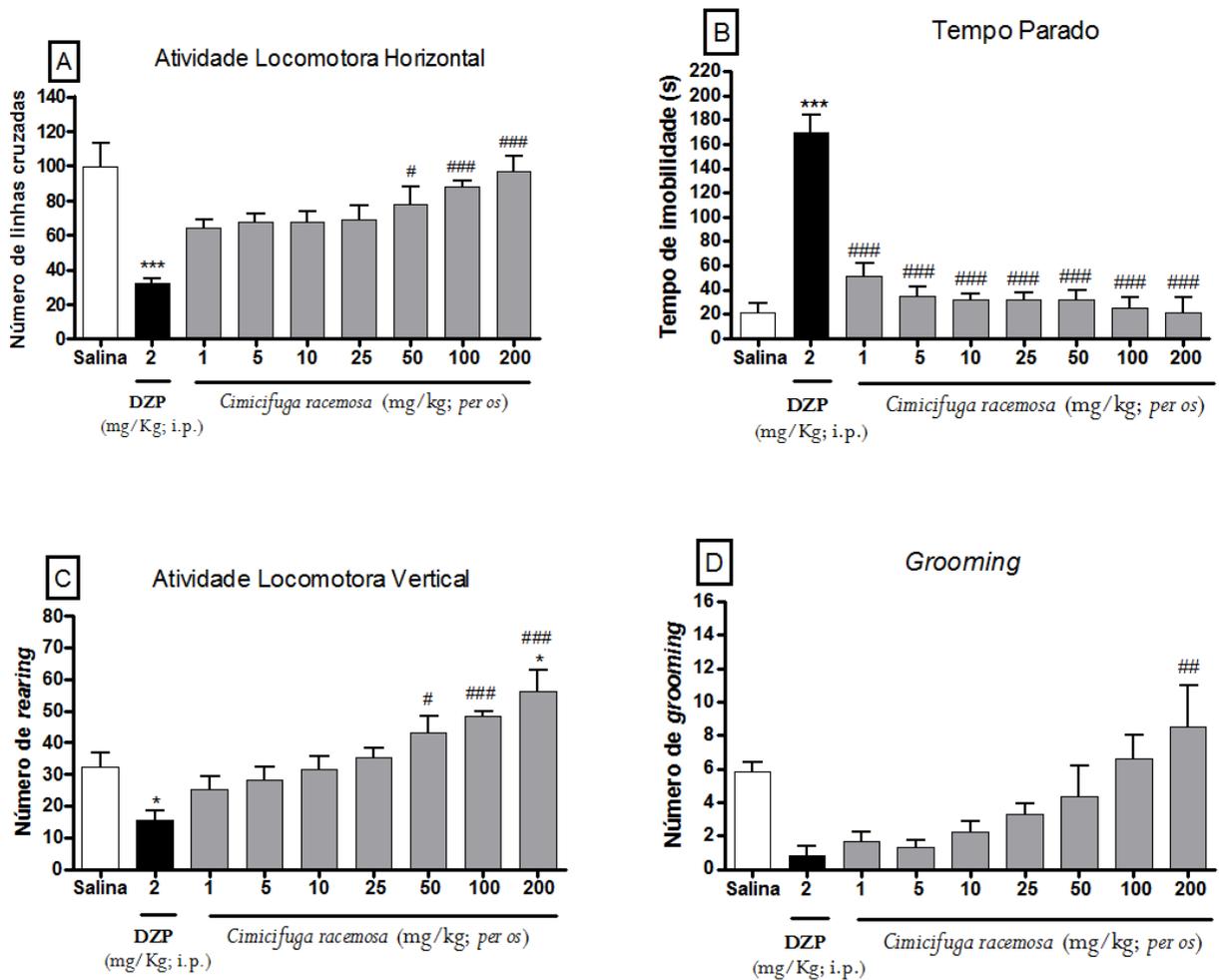
6.2 Avaliação da Atividade Locomotora

6.2.1 Teste do Campo Aberto (*Open field test*)

No teste do Campo Aberto, observou-se que animais tratados com DZP reduziu em 68% o número de linhas cruzadas (atividade locomotora horizontal), 52% do número de levantamentos sob as patas traseiras (*rearing*/atividade locomotora vertical) e 86% do número de comportamentos de auto-limpeza (*grooming*) (Cruzamento, $32,0 \pm 3,0$, número de linhas cruzadas; *rearing*, $15,5 \pm 2,9$, número de vezes executado; *grooming*, $0,8 \pm 0,5$, número de vezes executado), respectivamente, em relação ao grupo Controle (Cruzamentos, $99,7 \pm 13,3$, número de linhas cruzadas; *rearing*, $32,2 \pm 4,7$, número de vezes executado; *grooming*, $5,8 \pm 0,6$, número de vezes executado), no entanto, DZP aumentou o tempo de imobilidade em 695% ($169,6 \pm 14,7$ segundos), em relação ao Controle ($21,33 \pm 7,2$, segundos).

Quando os animais foram submetidos ao tratamento com Cr (1; 5; 10; 25; 50; 100 e 200 mg/Kg; *per os*) não apresentaram alterações no número de linhas cruzadas ($64,1 \pm 5,0$; $67,6 \pm 5,0$; $67,2 \pm 6,7$; $68,8 \pm 8,0$; $77,8 \pm 9,8$; $87,8 \pm 3,2$ e $90,5 \pm 9,8$, respectivamente), quando comparados ao Controle ($99,7 \pm 13,3$) (Figura 16 A). Não houve também diferença significativa entre animais tratados com Cr e Controle no tempo de imobilidade (segundos, $51,0 \pm 10,7$; $35,0 \pm 7,1$; $31,8 \pm 4,4$; $32,2 \pm 5,5$; $32,2 \pm 7,3$; $24,8 \pm 8,8$ e $21,4 \pm 12,2$, respectivamente) (Figura 16 B). A maior dose de Cr, 200 mg/Kg, aumentou significativamente em 81% e 100%, respectivamente, o *rearing* e *grooming*, em relação ao Controle (Figura 16 C e 16 D).

Figura 16 - Análise da atividade motora no Teste do Campo aberto (*Open Field test*).



Fonte: Arquivo pessoal da Autora. **Legenda:** (A) número de cruzamentos, (B) Tempo de imobilidade, (C) *Rearing* e (D) *Grooming*. Os camundongos foram tratados com Cr (1; 5; 10; 25; 50; 100 e 200 mg/Kg; *per os*), Diazepam (DZP; 2 mg/Kg; i.p.) ou Controle (Salina 0,9%, *per os*). Após 1h, os animais foram submetidos ao teste de Campo Aberto. Os dados estão expressos em médias \pm EPM. *One-way* ANOVA, Bonferroni. *, ** e *** indicam diferenças $P < 0,05$, $P < 0,01$ e $P < 0,001$, respectivamente, em relação ao grupo Controle e #, ## e ### indicam diferenças $P < 0,05$, $P < 0,01$ e $P < 0,001$, respectivamente, em relação ao grupo DZP.

6.3 Avaliação da Atividade Ansiolítica

6.3.1 Teste da Placa Perfurada (Hole board test)

Na análise da avaliação exploratória, por meio do teste da placa perfurada, pôde-se observar que animais tratados com DZP (1 mg/Kg; i.p.), aumentaram significativamente ($P < 0,05$) o *head dips* em 85% e o tempo de permanência em 140% ($41,8 \pm 3,0$ número de vezes executado; e tempo de permanência: $38,5 \pm 5,0$ segundos, respectivamente), comparando ao grupo controle ($22,6 \pm 2$ número de vezes executado, $16,0 \pm 1,7$ segundos, respectivamente) (Figura 17 A e 17 B).

Os animais tratados com Cr (1; 5; 10; 25; 50; 100 e 200 mg/Kg) não apresentaram diferença significativa no número *head dips*, em relação ao grupo controle (Figura 17 A), entretanto, as doses 1, 10 e 25 mg/Kg (Cr), aumentaram significativamente ($P < 0,001$; $P < 0,05$, respectivamente) o tempo de permanência em 243%, 136% e 151%, respectivamente, em relação ao Controle (Cr 1 mg/Kg: $55,0 \pm 6,5$; Cr 10 mg/Kg: $37,8 \pm 5,1$; Cr 25 mg/Kg: $40,2 \pm 5,2$; Controle: $16,0 \pm 1,7$, segundos) (Figura 17 B).

6.3.2 Teste de Labirinto em Cruz Elevado (Plus maze test)

Para verificar uma ação ansiolítica induzida por Cr, utilizou-se do teste de Labirinto em Cruz Elevado (Plus maze test), onde os parâmetros analisados foram o número de entradas nos braços abertos (NEBA), a percentagem de entradas nos braços abertos (PEBA), o tempo de permanência nos braços abertos (TPBA) e a percentagem do tempo de permanência (PTBA). O DZP (1 mg/kg), como esperado, induziu um aumento significativo ($P < 0,001$) em todos os parâmetros analisados [(NEBA ($8,0 \pm 0,6$ número de vezes), TPBA ($57,2 \pm 8,9$ s), PEBA ($42,1 \pm 3,2\%$) e PTBA ($40,6 \pm 4,1\%$)] quando comparado ao controle (NEBA: $1,0 \pm 0,4$ número de vezes executado; TPBA: $2,5 \pm 1,0$ s; PEBA: $6,3 \pm 3,04\%$; e PTBA: $1,7 \pm 0,6\%$, respectivamente) (Figura 18).

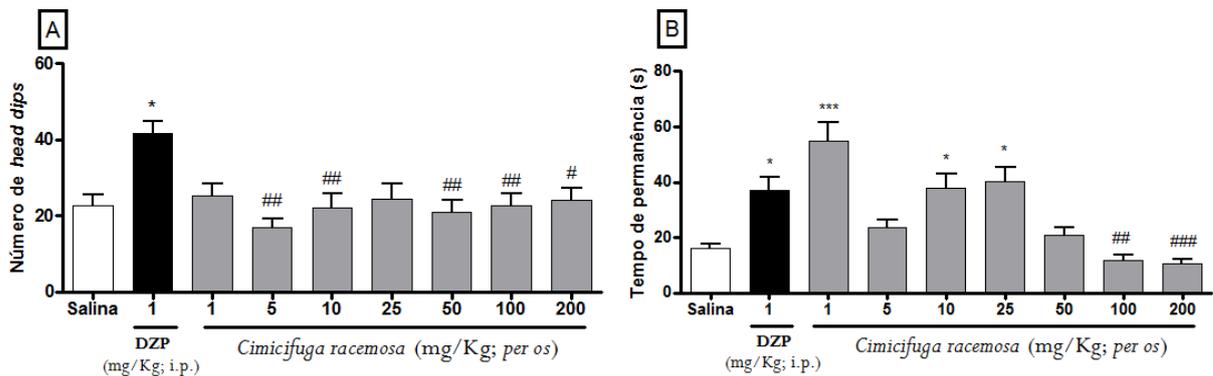
O tratamento com Cr não apresentou alterações significativas no NEBA (1 mg/Kg: $2,6 \pm 0,4$; 5 mg/Kg: $2,0 \pm 0,7$; 10 mg/Kg: $1,8 \pm 0,6$; 25 mg/Kg: $2,0 \pm 0,7$; e 200 mg/Kg: $2,2 \pm 0,6$ número de vezes executado, respectivamente) (Figura 18 A), TPBA (1 mg/Kg: $12,7 \pm 3,3$; 5 mg/Kg: $9,9 \pm 4,0$; 10 mg/Kg: $6,9 \pm 2,8$; 25 mg/Kg: $11,4 \pm 4,9$; 200 mg/Kg: $4,6 \pm 1,8$ s, respectivamente) (Figura 18 B), PEBA (1 mg/Kg: $23,9 \pm 3,8$; 5 mg/Kg: $22,4 \pm 2,3$; 10 mg/Kg: $24,7 \pm 7,1$; 25 mg/Kg: $23,8 \pm 6,9$ e 200 mg/Kg: $9,6 \pm 2,9\%$, respectivamente) (Figura 18 C) e

PTBA (1 mg/Kg: $12,7 \pm 3,3$; 5 mg/Kg: $9,9 \pm 4,0$; 10 mg/Kg: $6,9 \pm 2,8$; 25 mg/Kg: $11,4 \pm 4,9$; e 200 mg/Kg: $4,6 \pm 1,8$, respectivamente) (Figura 18 D), em relação ao grupo Controle.

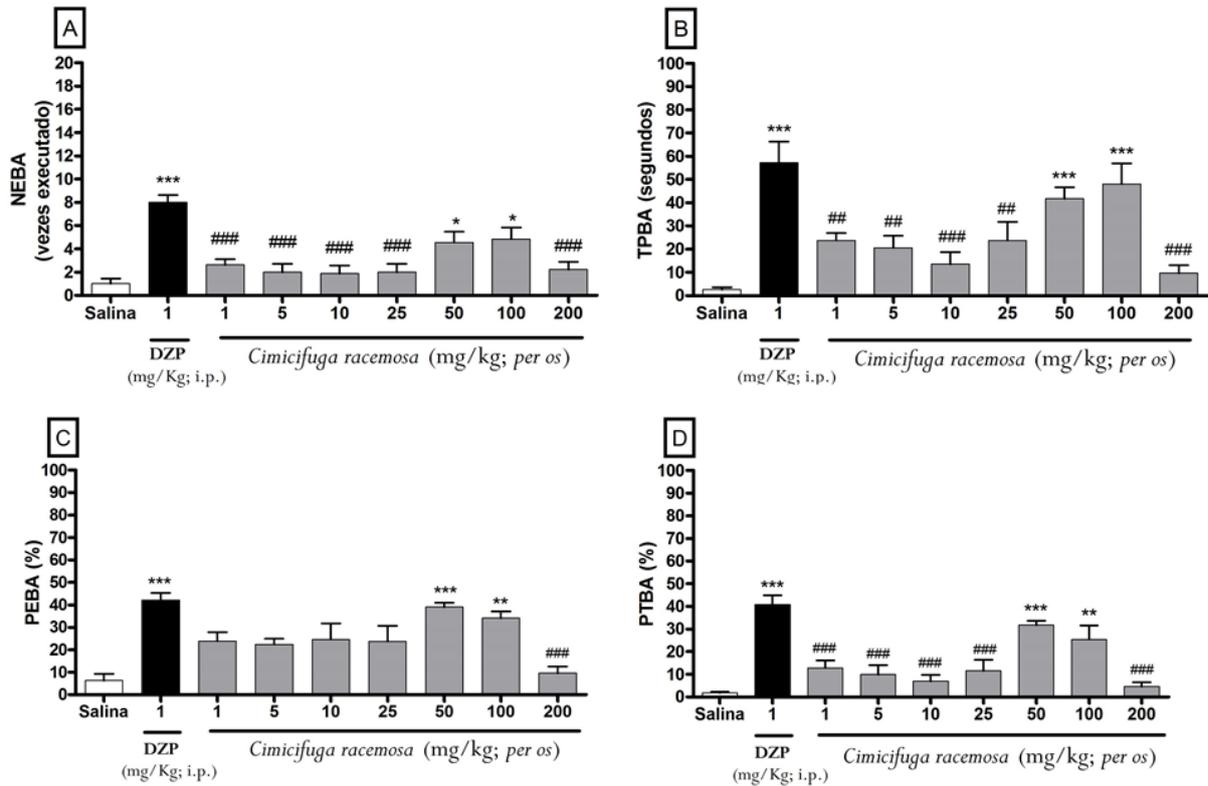
Entretanto, Cr, nas doses de 50 e 100 mg/Kg, aumentaram, em aproximadamente 40 e 35% o PEBA, em 30 e 25% o PTBA, respectivamente, em relação ao Controle, não diferindo do DZP em nenhum dos quatro parâmetros avaliados (Figura 18).

Ao analisar o envolvimento dos receptores benzodiazepínicos no efeito ansiolítico no grupo de animais tratados com Cr (100 mg/Kg) e pré-tratados com Flumazenil (2,5 mg/Kg), houve redução em todos os parâmetros avaliados, quando comparados ao grupo de animais tratados com Cr (100 mg/Kg): PEBA (Cr 100 mg/Kg: $34,3 \pm 3,0\%$; FLU + Cr 100 mg/Kg: $8,5 \pm 3,5\%$) (Figura 19 A) e PTBA (Cr 100 mg/Kg: $29,8 \pm 5,3\%$; FLU + Cr 100 mg/Kg: $10,3 \pm 3,6\%$), respectivamente (Figura 19 B).

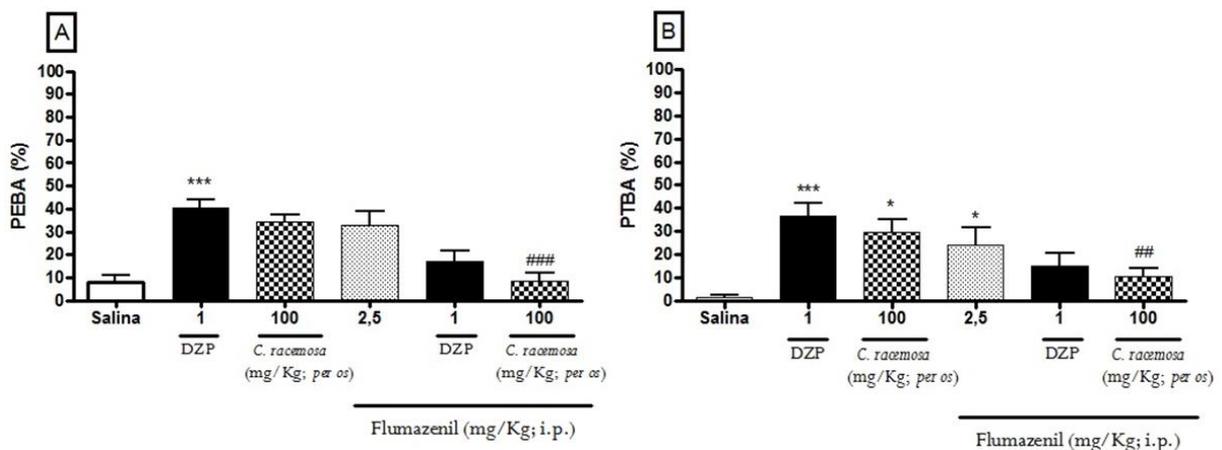
Figura 17 - Teste da Placa Perfurada (*Hole Board test*).



Fonte: Arquivo pessoal da Autora. **Legenda:** (A) Número de vezes que o animal colocou a cabeça e (B) tempo de permanência. Os camundongos ($n = 9$ por grupo, machos, pesando aproximadamente 35-40 g) foram tratados com Cr (1; 5; 10; 25; 50; 100 e 100 mg/Kg; *per os*), Diazepam (1 mg/Kg; *i.p.*) ou Controle (Salina 0,9%, *per os*). Após 1h, os animais foram observados durante 5 min na placa perfurada (*hole board*). Os dados estão expressos em médias \pm EPM. *One-way* ANOVA, Bonferroni. * indica diferença $P < 0,05$, em relação ao grupo Controle e #, ## e ### indicam diferenças $P < 0,05$, $P < 0,01$ e $P < 0,001$, respectivamente, em relação ao grupo DZP.

Figura 18 - Labirinto de Cruz Elevado (*Plus-maze test*).

Fonte: Arquivo pessoal da Autora. **Legenda:** (A) Número de entradas nos braços abertos (NEBA), (B) Tempo de permanência nos braços abertos (TPBA), (C) Percentagem de entradas nos braços abertos (PEBA) e (D) Percentagem do tempo nos braços abertos (PTBA). Os camundongos ($n = 9$ por grupo, machos, pesando aproximadamente 35-40 g) foram tratados com Cr (1; 5; 10; 25; 50; 100 e 100 mg/Kg; *per os*), Diazepam (1 mg/Kg; *i.p.*) ou Controle (Salina 0,9%, *per os*). Após 1h, os animais foram observados durante 5 min no labirinto de Cruz elevado (*Plus-maze*). Os dados estão expressos em médias \pm EPM. *One-way ANOVA*, Bonferroni. *, ** e *** indicam diferenças $P < 0,05$, $P < 0,01$ e $P < 0,001$, respectivamente, em relação ao grupo Controle e ## e ### indicam diferenças $P < 0,01$ e $P < 0,001$, respectivamente, em relação ao grupo DZP.

Figura 19 - Labirinto de Cruz Elevado (*Plus-maze test*) com Flumazenil.

Fonte: Arquivo pessoal da Autora. **Legenda:** (A) Percentagem do Número de Entradas nos Braços Abertos e (B) Percentagem do Tempo de Permanência nos Braços Abertos. Os camundongos ($n = 9$ por grupo, machos, pesando aproximadamente 35-40 g) foram tratados com Cr (100 mg/Kg; *per os*), Diazepam (1 mg/Kg; *i.p.*) e Cr (100 mg/Kg; *per os*), Diazepam (1 mg/Kg; *i.p.*) pré-tratados com Flumazenil (2,5 mg/Kg; *i.p.*) ou Controle (Salina 0,9%, *per os*). Após 1h os animais foram observados durante 5 min no labirinto de Cruz elevado (*Plus-maze*),

sendo considerados o percentual do número de vezes que o animal entrou nos braços abertos e o seu o tempo de permanência no mesmo. Os dados estão expressos em médias \pm EPM. *One-way* ANOVA, Bonferroni. * e *** indicam diferenças $P < 0,05$ e $P < 0,001$, respectivamente, em relação ao grupo Controle e ## e ### indicam diferenças $P < 0,01$ e $P < 0,001$, respectivamente, em relação ao grupo DZP.

6.4 Avaliação da Atividade Antidepressiva

6.4.1 Teste da Suspensão da Cauda

Para verificar a atividade antidepressiva, utilizou-se do teste da suspensão da cauda, onde observou-se o tempo de imobilidade do animal (segundos). A Imipramina (30 mg/Kg) foi utilizada como droga padrão e, como esperado, diminuiu ($P < 0,05$) o tempo de imobilidade em 49% (IMI: $44,4 \pm 9,2$ s), quando comparado ao grupo controle ($87,5 \pm 2,6$ s).

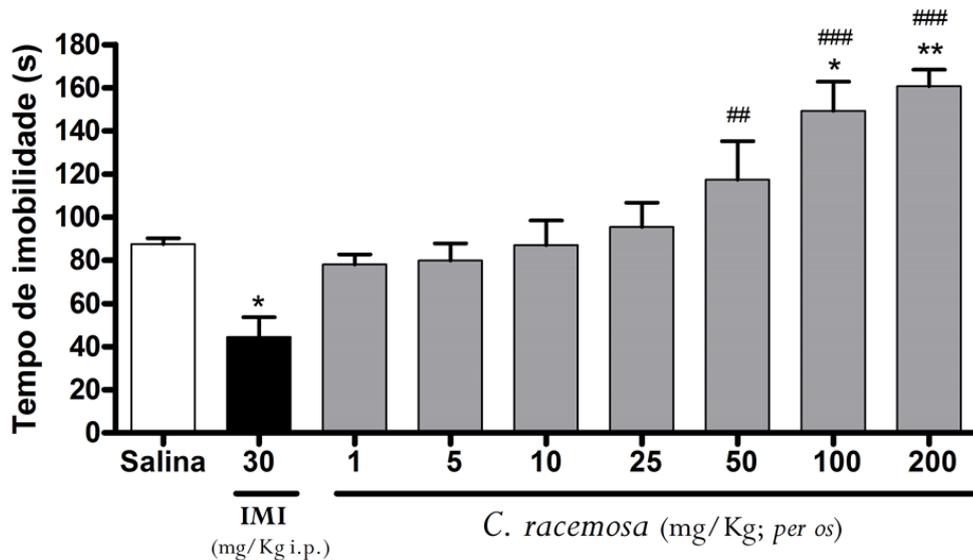
De acordo com os resultados, Cr (100 e 200 mg/Kg) aumentou significativamente ($P < 0,05$ e $P < 0,01$, respectivamente), o tempo de imobilidade em 70 e 84% respectivamente, em relação ao grupo Controle, (Cr 100 mg/Kg: $149,3 \pm 13,6$ s; Cr 200 mg/Kg: $160,8 \pm 7,6$ s) (Figura 20).

6.4.2 Teste do Nado Forçado

O tempo de imobilidade dos animais foi o parâmetro avaliado neste teste. Os resultados demonstraram que Imipramina (10 mg/Kg), droga padrão, reduziu ($P < 0,0001$) o tempo de imobilidade em 53% (IMI: $60,8 \pm 7,7$ s), em relação ao grupo Controle ($128,5 \pm 5,0$ s).

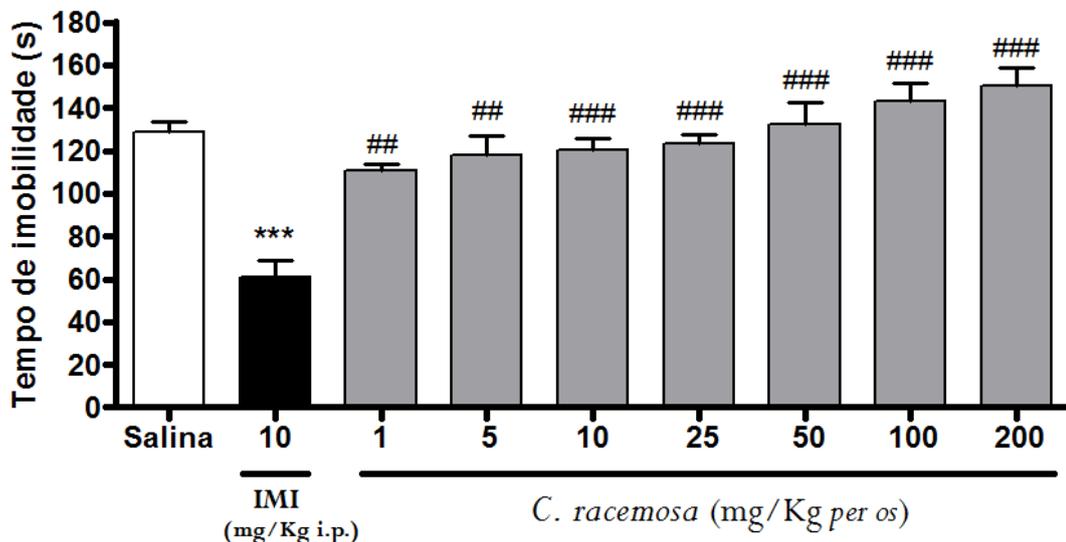
Os animais submetidos ao tratamento com Cr não apresentaram alterações no tempo de imobilidade (Cr 1 mg/Kg: $110,7 \pm 2,7$; Cr 5 mg/Kg: $118,0 \pm 9,0$ s; Cr 10 mg/Kg: $120,5 \pm 5,1$ s; Cr 25 mg/Kg: $123,4 \pm 4,5$ s; Cr 50 mg/Kg: $132,3 \pm 10,2$ s; Cr 100 mg/Kg: $143,4 \pm 8,1$ s; Cr 200 mg/Kg: $150,5 \pm 8,1$ s), em relação ao grupo Controle (Figura 21).

Figura 20 - Teste da Suspensão da Cauda.



Fonte: Arquivo pessoal da Autora. **Legenda:** Os camundongos (n = 9 por grupo, machos, pesando aproximadamente 35-40 g) foram tratados com Cr (1; 5; 10; 25; 50; 100 e 200 mg/Kg; *per os*), Imipramina (30 mg/Kg; i.p.) ou Controle (Salina 0,9%, *per os*). Após 1h, os animais foram observados durante 6 min no teste da suspensão da cauda, sendo considerado o tempo de imobilidade. Os dados estão expressos em médias ± EPM. *One-way* ANOVA, Bonferroni. * indica diferença $P < 0,05$, em relação ao grupo Controle, e #, ## e ### indicam diferenças $P < 0,05$, $P < 0,01$ e $P < 0,001$, respectivamente, em relação ao grupo IMI.

Figura 21 - Teste do Nado Forçado.



Fonte: Arquivo pessoal da Autora. **Legenda:** Os camundongos (n = 9 por grupo, machos, pesando aproximadamente 35-40 g) foram tratados com Cr (1; 5; 10; 25; 50; 100 e 200 mg/Kg; *per os*), Imipramina (10 mg/Kg; i.p.) ou Controle (Salina 0,9%, *per os*). Após 1h, os animais foram observados durante 5 min no teste do nado forçado, sendo considerado o tempo de imobilidade. Os dados estão expressos em médias ± EPM. *One-way* ANOVA, Bonferroni. *** indica diferença $P < 0,001$, em relação ao grupo Controle, e #, ## e ### indicam diferenças $P < 0,05$, $P < 0,01$ e $P < 0,001$, respectivamente, em relação ao grupo IMI.

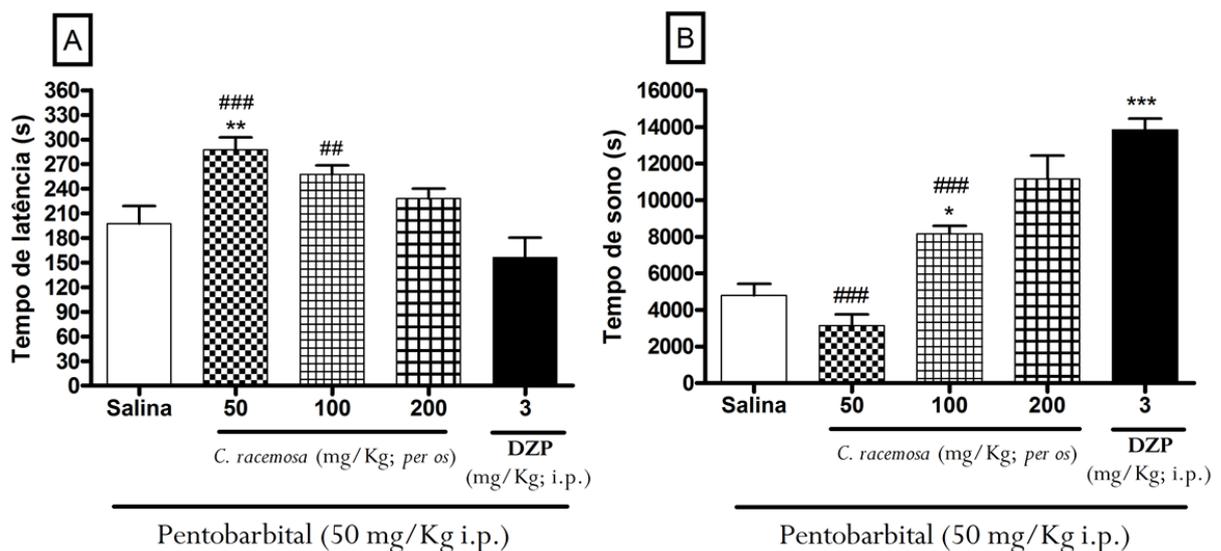
6.5 Avaliação da Atividade Sedativa/Hipnótica

6.5.1 Teste do Tempo de Sono Induzido por Pentobarbital

De acordo com a análise dos resultados, Cr (100 e 200 mg/kg) e DZP não apresentaram alterações significativas na latência do sono (Cr 100 mg/Kg: $257,1 \pm 11,0$ s; Cr 200 mg/Kg: $228,0 \pm 12,0$ s; DZP: $156,0 \pm 24,0$ s), em relação ao grupo Controle ($197,1 \pm 21,5$ s).

Na análise da duração do sono induzido por pentobarbital, apenas Cr, na dose de 50 mg/Kg, não alterou esse parâmetro (Cr 50 mg/Kg: $3.140,0 \pm 632,9$ s), quando comparado ao grupo Controle ($4.800,0 \pm 627,4$ s). No entanto, Cr, nas doses de 100 e 200 mg/Kg, potencializaram o tempo de sono em 70% e 132% (Cr 100 mg/Kg: $8.160,0 \pm 437,9$; Cr 200 mg/Kg: $11.170,0 \pm 1264,0$, segundos), respectivamente, em comparação ao grupo Controle (Figura 22).

Figura 22 - Teste do Tempo de Sono Induzido por Pentobarbital.



Fonte: Arquivo pessoal da Autora. **Legenda:** (A) Tempo de latência do sono e (B) Tempo de sono. Os camundongos ($n = 9$ por grupo, machos, pesando aproximadamente 35-40 g) foram tratados com Cr (50; 100 e 200 mg/Kg; *per os*), DZP (3 mg/Kg; i.p.) ou Controle (Salina 0,9%, *per os*), 30 min (i.p.) ou 1h (*per os*) antes dos experimentos, e em seguida administrado Pentobarbital (50 mg/Kg i.p.) e observados durante no máximo 240 min no teste do tempo de sono induzido por pentobarbital, sendo considerado o tempo de latência e duração do sono. Os dados estão expressos em médias \pm EPM. *One-way* ANOVA, Bonferroni. *, ** e *** indicam diferenças $P < 0,05$, $P < 0,01$ e $P < 0,001$, em relação ao grupo Controle, e ## e ### indicam diferenças $P < 0,01$ e $P < 0,001$, respectivamente, em relação ao grupo DZP.

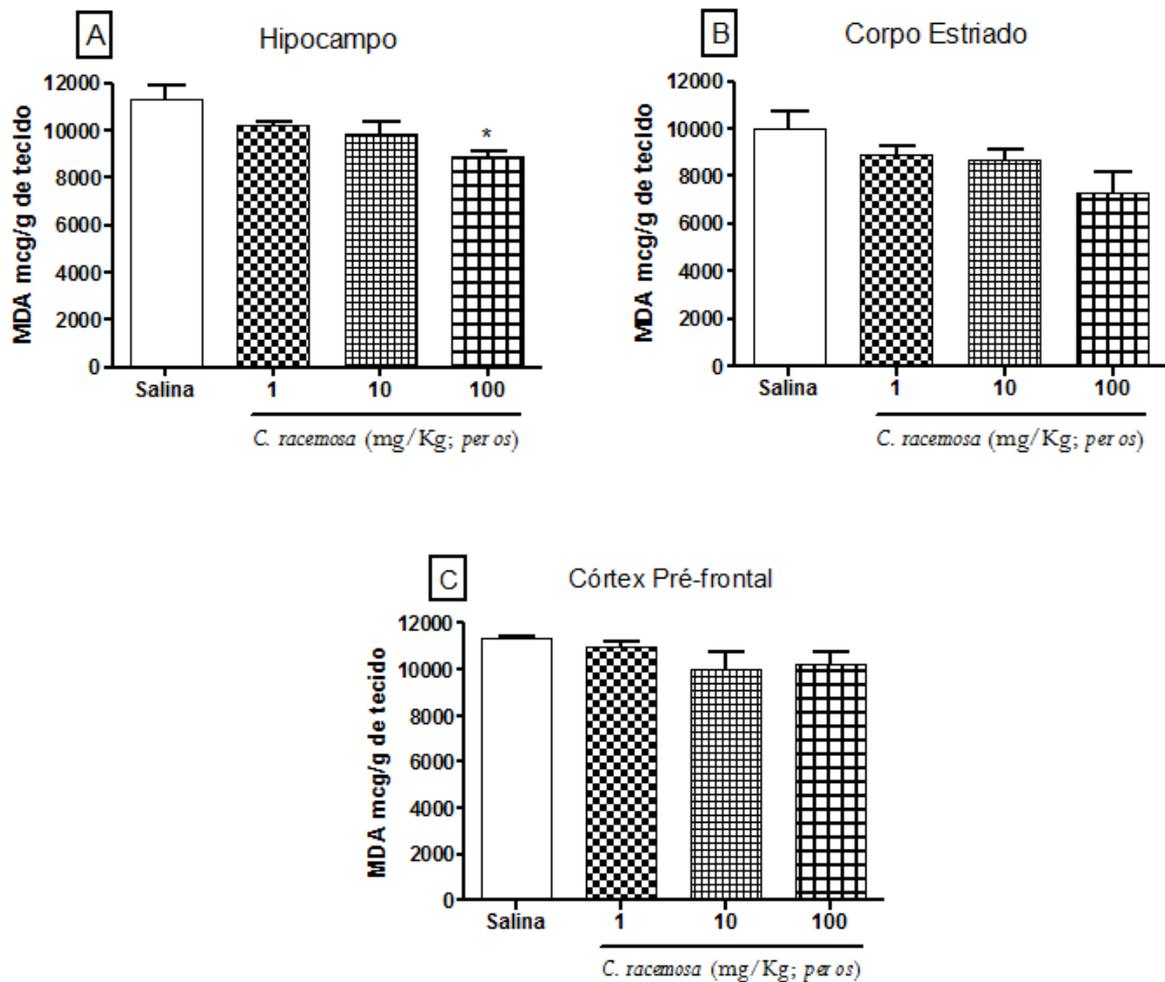
6.6 Análises Neuroquímicas

6.6.1 Determinação da Peroxidação Lipídica (TBARS)

Para investigar uma possível ação antioxidante, utilizou-se o ensaio de TBARS em amostras cerebrais. De acordo com os resultados obtidos, Cr (100 mg/Kg) reduziu ($P < 0,05$) em 22% os níveis de malonildialdeído (MDA) em hipocampo, quando comparado ao grupo Controle (Figura 23 A).

Por outro lado, nas demais áreas cerebrais (corpo estriado e córtex pré-frontal), nenhuma das doses de Cr apresentaram alterações significativas, em relação ao grupo Controle (Figura 23 B e 23 C).

Figura 23 - Análise dos Níveis de Peroxidação Lipídica (TBARS) nas Áreas Cerebrais.



Fonte: Arquivo pessoal da Autora. **Legenda:** (A) Hipocampo, (B) Corpo Estriado e (C) Córtex Pré-frontal. Os camundongos (n = 3 por grupo, machos, pesando aproximadamente 35-40 g) foram tratados com Cr (1,0; 10,0 e 100,0 mg/Kg; *per os*). Após 24 h, decorrido as análises comportamentais, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical removidos os encéfalos para análises neuroquímicas. Os dados estão expressos em médias \pm EPM. ANOVA, *One-way* Bonferroni. * indica diferença $P < 0,05$, em relação ao grupo Controle.

6.7 Determinação da expressão do RNAm de mediadores Neuroinflamatórios e BDNF através de PCR quantitativa em tempo real (qPCR)

6.7.1 Análise do RNA Total Isolado de Hipocampo de Camundongos

Os RNA's isolados de todas as amostras apresentaram-se com qualidade, quando analisados por espectrofotometria (ab260/280 nm; AB >1.7) (Tabela 4) e por eletroforese (dados não mostrados).

Tabela 4 - Quantificação do RNA total.

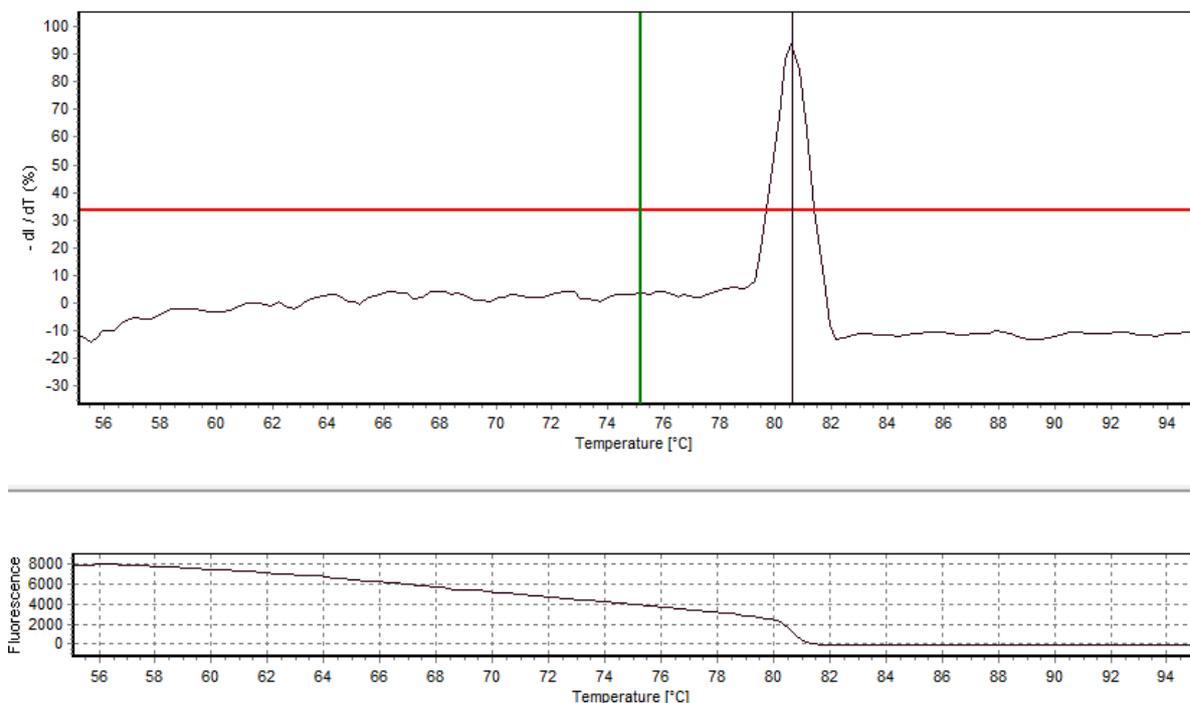
Grupo/amostra	Concentração ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	AB 260/280
Salina 1	456	1,710
Salina 2	546	1,800
Salina 3	258	3,583
Salina 4	198	4,125
Salina 5	434	1,695
Salina 6	738	1,752
Salina 7	192	3,310
Salina 8	348	1,830
Imipramina 1	432	1,761
Imipramina 2	296	1,737
Imipramina 3	316	1,819
Imipramina 4	522	1,717
Imipramina 5	124	1,775
Imipramina 6	422	1,786
Imipramina 7	326	1,680
Imipramina 8	106	3,118
Diazepam 1	278	1,716
Diazepam 2	284	1,806
Diazepam 3	322	1,725
Diazepam 4	396	1,703
Diazepam 5	352	1,731
Diazepam 6	708	1,764
Diazepam 7	494	1,805
Cr 50 1	180	1,764
Cr 50 2	192	1,755
Cr 50 3	240	1,722
Cr 50 4	66	1,941
Cr 50 5	258	1,720
Cr 50 6	174	1,773
Cr 50 7	416	1,731

Fonte: Laboratório de Genética Molecular – NUBIS/Sobral.

6.7.2 Avaliação da Especificidade dos Oligonucleotídeos (primers) utilizados através da Análise da Melting Curve

No presente estudo, as análises da *melting curve* indicaram a ausência de ampliações inespecíficas em todos os produtos amplificados (amplicons), após a reação de qPCR, demonstrando especificidade de todos os oligonucleotídeos (primers) utilizados no experimento (Figura 24).

Figura 24 - Análise da Curva de *Melting*.



Fonte: Arquivo pessoal da Autora. **Legenda:** Imagem ilustrativa dos resultados obtidos da curva de *melting* após a reação de amplificação por qPCR.

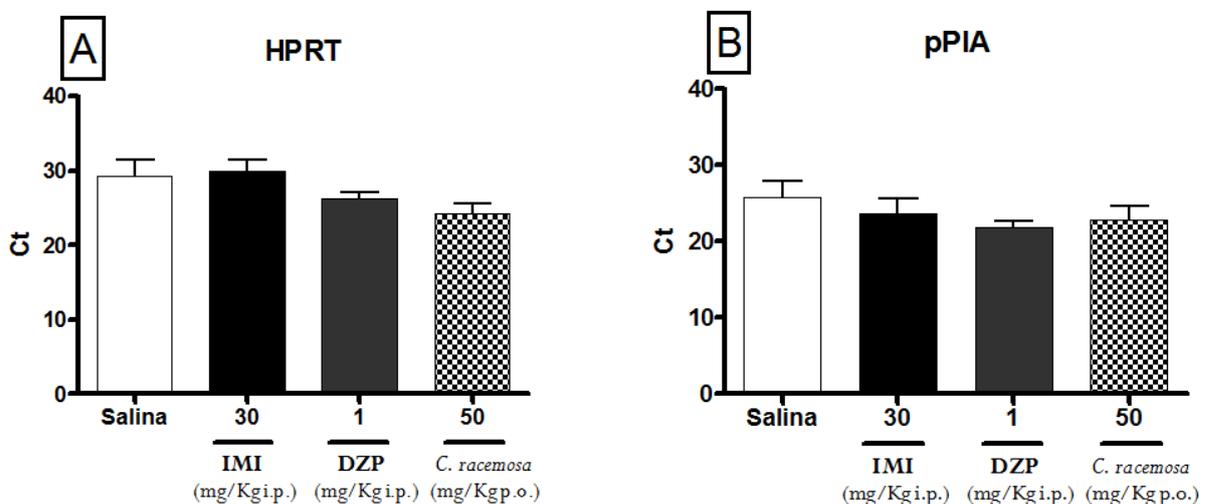
6.7.3 Análise do Genes de Controle Endógeno (Housekeeping) nas Condições de Estudo Utilizadas

Antes da normalização dos dados de expressão gênica, obtidos por PCR em tempo real (qPCR), inicialmente, avaliaram-se possíveis alterações na expressão dos genes de controle endógeno (housekeeping) utilizados no presente estudo (HPRT e PPIA).

Os dados obtidos, considerando a expressão basal de cada gene analisado em cyclothreshold (CT), mostram ausência de diferenças significativas na expressão dos genes de

controle endógeno analisados entre os grupos Imipramina (IMI; 30 mg/Kg; i.p.) (HPRT: $24,9 \pm 1,3$; pPIA: $26,3 \pm 1,8$), Diazepam (DZP; 1 mg/Kg i.p.) (HPRT: $24,9 \pm 1,3$; pPIA: $26,3 \pm 1,8$) e Cr (50 mg/Kg per os) (HPRT: $24,9 \pm 1,3$; pPIA: $26,3 \pm 1,8$), em relação ao grupo Salina (0,9%) (HPRT: $24,9 \pm 1,3$; pPIA: $26,3 \pm 1,8$) (Figura 25). Desta forma, os referidos genes de controle endógeno analisados mostram-se eficientes como normalizadores fisiológicos, uma vez que não apresentaram alterações significantes decorrentes das modulações farmacológicas utilizadas (IMI, DZP e Cr), em relação a animais do grupo Salina.

Figura 25 - Análise da expressão de RNA mensageiro dos genes de controle endógeno.



Fonte: Arquivo pessoal da Autora. **Legenda:** Os animais foram tratados com Salina (0,9%), Imipramina (IMI; 30 mg/Kg i.p.), Diazepam (DZP; 1 mg/Kg i.p.) ou Cr (50 mg/Kg; per os). Após eutanásia, os hipocampos foram removidos e utilizados para extração de RNA total. Após síntese do cDNA, os níveis do RNAm de (A) HPRT e (B) pPIA foram analisados por qPCR. *One-way* ANOVA, Bonferroni. * indica $P < 0,05$, em relação ao grupo Salina.

6.7.4 Análise dos Efeitos de Cr na Expressão de BDNF, cFOS, cJUN, EaaT1 e TRKB-F em Hipocampo de Camundongos por qPCR

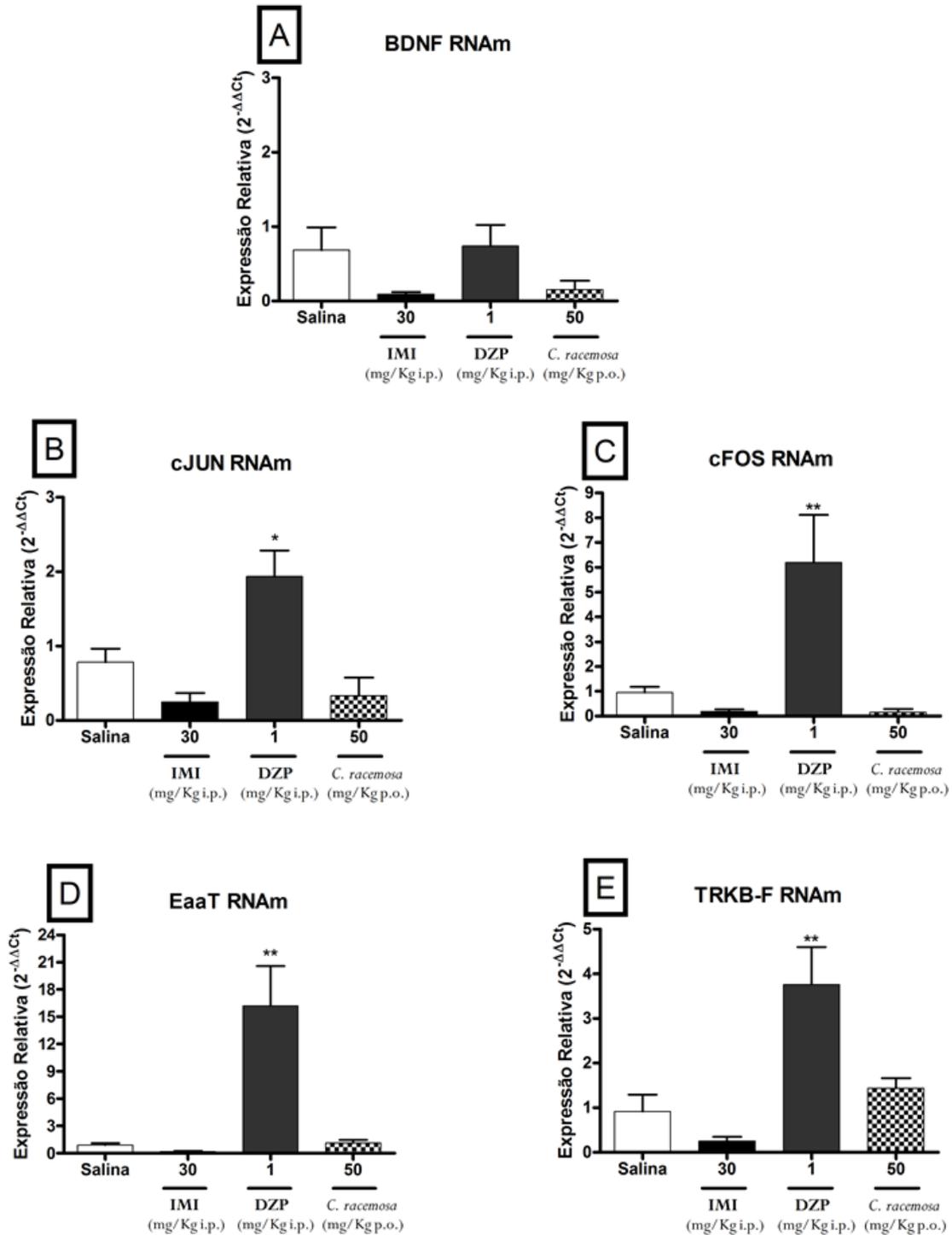
Para se avaliar os efeitos de Cr e das drogas padrões utilizadas no presente estudo, a nível transcricional, realizou-se análise da expressão dos genes BDNF, cJUN, cFOS, EaaT1 e TRKB-F, envolvidos na atividade ansiolítica/antidepressiva e neuroprotetora.

De acordo com os resultados, animais tratados com Cr (50 mg/Kg/ per os) ou com o antidepressivo Imipramina (IMI; 30 mg/Kg i.p.) não apresentaram alterações significantes em nenhum dos genes analisados (BDNF: $0,16 \pm 0,12$ e $0,09 \pm 0,02$; cJUN: $0,33 \pm 0,24$ e $0,25 \pm 0,12$; cFOS: $0,15 \pm 0,14$ e $0,18 \pm 0,09$; EaaT1: $1,15 \pm 0,34$ e $0,19 \pm 0,06$; e TRKB-F: $1,44 \pm$

0,22 e $0,25 \pm 0,09$ vezes, respectivamente), em relação ao grupo Salina (BDNF: $0,68 \pm 0,31$; cJUN: $0,78 \pm 0,18$; cFOS: $0,95 \pm 0,24$; EaaT1: $0,89 \pm 0,22$; e TRKB-F: $0,92 \pm 0,38$ vezes, respectivamente). Entretanto, Cr 50 demonstrou uma tendência a reduzir os níveis de RNAm de cFOS em 84%. Em adição, Imipramina também apresentou uma tendência a reduzir os níveis de RNAm de BDNF, cJUN e cFOS em 87%, 68% e 81%, respectivamente (Figura 26).

Animais tratados com o ansiolítico Diazepam (DZP; 1 mg/Kg i.p.) aumentaram significativamente os níveis de RNAm de cJUN em 149% ($P < 0,05$; $1,94 \pm 0,35$ vezes), cFOS em 553% ($P < 0,01$; $6,20 \pm 1,92$ vezes), EaaT1 em 1721% ($P < 0,01$; $16,21 \pm 4,29$ vezes) e TRKB-F em 309% ($P < 0,01$; $3,76 \pm 0,85$ vezes), em relação ao grupo Salina. Adicionalmente, não foram encontradas diferenças significativas nos níveis de RNAm de BDNF entre o grupo DZP ($0,74 \pm 0,28$ vezes) e Salina.

Figura 26 - Análise por qPCR.



Fonte: Arquivo pessoal da Autora. **Legenda:** Os animais foram tratados com Salina (0,9%), Imipramina (IMI; 30 mg/Kg i.p.), Diazepam (DZP; 1 mg/Kg i.p.) ou Cr (50 mg/Kg; *per os*). Após eutanásia, os hipocampus foram removidos e utilizados para extração de RNA total. Após síntese do cDNA, os níveis de (A) BDNF, (B) cJUN, (C) c-FOS, (D) EaaT1, e (E) TRKB-F foram analisados por qPCR. *One-way* ANOVA, Bonferroni. * e ** indicam $P < 0,05$ e $P < 0,01$, respectivamente, em relação ao grupo Salina.

7 Discussão

Apesar de vários estudos sobre os efeitos de princípios ativos de *C. racemosa* em modelos *in vivo* e *in vitro*, relacionados ao tratamento dos sintomas da menopausa, seu mecanismo de ação ainda não é totalmente compreendido (PALACIO; MASRI; MOORRADIAN, 2009; BEDELL; NACHTIGALL; NAFTOLIN, 2014; WUTTKE et al., 2014).

De acordo com a literatura, os efeitos climatéricos induzidos por Cr têm sido associados a um mecanismo de interação com o SNC (RUHLEN; SUN; SAUTER, 2008). Por este motivo, no presente estudo, foram realizadas observações pré-clínicas iniciais segundo Carline e colaboradores (1972), as quais podem indicar alterações associadas com o sistema nervoso e auxiliarem na identificação de efeitos a nível central, como estimulantes ou depressores, e/ou no sistema nervoso autônomo. Os resultados sugerem que este fitoterápico age no SNC e também no SNA (sistema nervoso autônomo), demonstrando alterações indicativas de depressão e/ou sedação, como a redução da atividade locomotora, sonolência e perda do tônus muscular (Tabela 2).

De acordo com Beer e Neff (2013), a literatura reporta vários estudos sobre a segurança farmacológica de Cr, a qual cita apresentar uma tolerância boa em humanos, não promovendo alterações significativas, em relação ao uso de placebos, com cerca de mais de 13 mil usuários, esses dados corroboram com os desta dissertação, onde mostra que não houve nenhuma alteração fisiológica e peso úmido dos órgãos, mostrando uma confiabilidade na administração de Cr (Tabela 3), também pode-se observar que a administração via oral não causou nenhum dano na mucosa gástrica (Figura 15), como também as análises de peroxidação lipídica não foi alterada (Figura 23), mostrando que Cr não induz danos oxidativos.

Para investigar mais especificamente os efeitos de Cr no SNC, foram realizadas análises em camundongos submetidos a modelos clássicos de avaliação neurocomportamental.

Os primeiros modelos animais de ansiedade surgiram a partir de pequenos ajustes de procedimentos de aprendizagem associativa consagrados pelo behaviorismo para avaliar o potencial terapêutico de drogas ansiolíticas. Sob a influência da etologia (HALL, 1934; LORENZ, 1995), modelos animais de ansiedade, fundamentados em reações de defesa frente a estímulos ou situações naturalmente aversivas, passaram também a ocupar um lugar de destaque no estudo experimental da ansiedade. Incorporando esse princípio às vantagens oferecidas pelo método experimental, essa abordagem passou a ser chamada análise

etoexperimental e, posteriormente, análise etofarmacológica da ansiedade, uma vez que envolvia a manipulação de fármacos (BLANCHARD; BLANCHARD, 1998; LISTER, 1990).

Entre alguns dos modelos mais importantes para estudos com abordagem em ensaios de ansiedade estão o Campo Aberto e Labirinto em Cruz Elevado.

O diazepam na dose de 2 mg/Kg, vem sendo utilizado para avaliar a atividade locomotora em experimentos animais, para mostrar seu efeito sedativo e assim poder relacionar com novas drogas (SOUZA et al., 2007; MELO et al., 2010), o aumento ou a diminuição deste comportamento é sugestivo para avaliar o nível de ansiedade (CRAWLEY, 1985; PELLOW et al., 1985). De acordo com os dados obtidos, pôde-se observar que o tratamento crônico com Cr não alterou a atividade locomotora dos animais, mas mostrou que tem uma tendência a aumentar a locomoção a medida que houve um aumento da dose (Figura 16 A). Corroborando com este estudo, testes realizados com o extrato de *C. racemosa* BNO 1055 em ratas, também não indicaram alterações na atividade locomotora após o período de tratamento de oito dias (WINTERHOFF et al., 2003).

De acordo com Espejo (1997) e Swanson e Colaboradores (1997), o número de *rearing* vem sendo descrito como um comportamento exploratório. O *rearing* consiste no ato do animal levantar-se sobre as patas traseiras, para uma possível investigação do ambiente que lhe foi condicionado. Este comportamento é descrito por estar relacionado com uma hiperatividade dopaminérgica (SWANSON et al., 1997). Como pode-se observar na Figura 16 C, não houve alterações neste comportamento nas doses testadas de Cr, com exceção a dose de 200 mg/Kg, que apresentou aumento do *rearing*. Assim, estes achados podem sugerir uma ação dopaminérgica induzida por Cr.

Archer (1973) observou em seus estudos o aumento de *grooming* em roedores apreensivos, alguns estudos observaram que a redução desta atividade em campo aberto está relacionada com drogas ansiolíticas (DUNN et al., 1981; MOODY; MERALI; CRAWLEY, 1993). Segundo Moody e Colaboradores (1993), vários transmissores podem modular a expressão deste comportamento. Entre estes neurotransmissores, pôde-se citar a dopamina que, segundo a literatura, está particularmente envolvida neste comportamento (DRAGO; CONTARINO; BUSA, 1999; SERAFIM; FILÍCIO, 2001; KALUEFF; TUOHIMAA, 2005). Neste estudo, Cr apresentou um aumento do *grooming* à medida que se aumentava a dose (Figura 16 D). Portanto, a partir dos resultados de *grooming* e *rearing*, sugere-se que Cr pode estar possivelmente relacionada com a modulação de dopamina.

A ativação de receptores dopaminérgicos D1 leva a locomoção, enquanto que a ativação de D2 produz o comportamento estereotipado (STARR; STARR, 1989; USHIJIMA; CARINO;

HORITA, 1995), o número excessivo de *grooming* tem sido usado para caracterizar desordens obsessivas compulsivas (FEUSNER; HEMBACHER; KATHARINE, 2009). Goodman e Gilman (2012) relatam que agonistas de receptores dopaminérgicos podem causar comportamentos estereotipados em animais e exacerbar os sintomas das doenças obsessivas compulsivas, no entanto, há evidências do envolvimento de vias glutamatérgicas no comportamento de animais que apresentam *grooming* excessivo (WELCH et al., 2007).

De acordo com os resultados obtidos na locomoção, sugere-se que o tratamento com Cr, em doses maiores com a de 200 mg/Kg, possa promover estímulo dos receptores dopaminérgicos D1, embora não tenha tido uma diferença significativa no aumento da atividade locomotora, houve uma tendência de aumento dessa atividade em escala dose-dependente. Pode-se sugerir então que a Cr cause um aumento na concentração de dopamina que, por sua vez, promoveria uma maior estimulação desses receptores dopaminérgicos.

O teste da placa perfurada foi introduzido inicialmente por Boissier e Simon (1962, 1964 apud TAKEDA et al., 1998), e consiste num método simples de avaliar a resposta de um animal a um ambiente não familiar, tanto em ratos como em camundongos, este teste pode refletir os estados ansiolíticos e ansiogênicos de uma droga, o estado ansiolítico em animais pode ser refletido por um aumento no comportamento de *head dips*. Com base em estudos e em informações que a expressão de um estado ansiolítico em animais pode refletir por um aumento no tempo de *head dips*, os resultados deste estudo forneceram evidências que Cr 1; 10 e 25 mg/Kg apresentam um efeito ansiolítico por se assemelharem com DZP (Figura 17).

O teste do labirinto em Cruz elevado (LCE) deriva de um trabalho de Montgomery (1955), que relacionou medo e atividade exploratória. Handley e Mitani (1984) então desenvolveram um labirinto elevado em X no qual a intensidade do medo natural induzido, poderia ser medida pela variação da proporção de exploração (comportamento exploratório) entre os braços abertos e fechados do equipamento. De uma forma geral, fármacos ansiolíticos aumentam, enquanto agentes ansiogênicos diminuem as entradas e o tempo de permanência nos braços abertos do LCE. Este teste busca verificar a aversão natural de um roedor por espaços abertos. Os índices de mensuração da ansiedade neste modelo, consiste de medidas relativas à frequência de entradas e tempo gasto nos braços abertos pelos animais.

Neste estudo, Cr nas doses de 50 e 100 mg/Kg aumentaram o número de entradas e do tempo de permanência nos braços abertos (Figura 18). Estas alterações indicam uma atividade exploratória de áreas consideradas aversivas ao animal, indicando um efeito ansiolítico, resultando da administração de Cr. Efeito similar foi observado em animais tratados com diazepam, um padrão utilizado como controle positivo (Figura 19). Estes dados assemelham-se

com os de Strommer e Colaboradores (2014), onde também foi observado um aumento da exploração nos braços abertos em doses baixas de Ac-SM (um isolado de *Actaea racemosa* (sinônimo para *C. racemosa*) 23-O-Acetylshengmanol 3-O-b-D-xylopyranoside – Ac-SM.), não afetando a atividade locomotora.

O Flumazenil (FLU) é um derivado imidabenzodiazepina, é um dos vários derivados 1,4-benzodiazepínico com alta afinidade pelo receptor benzodiazepínico (BDZs) que age como antagonista competitivo. No entanto, não antagoniza os efeitos de outros sedativos-hipnóticos no SNC como etanol, opióides e anestésicos gerais. O Flumazenil é também usado como droga para o diagnóstico de intoxicação pelos BDZs, liga-se especificamente aos receptores BDZs no cérebro, bloqueando os efeitos comportamentais, neurológicos e eletrofisiológicos de vários benzodiazepínicos (KLEINGEIST et al., 1998).

Para avaliar o mecanismo de ação envolvido no efeito ansiolítico, utilizou-se o Flumazenil (2,5 mg/Kg) 15 minutos antes da administração de Cr. Os resultados mostraram que FLU bloqueou a ação ansiolítica de Cr (100 mg/kg), sugerindo o envolvimento dos receptores GABA_A (Figura 19). Estes resultados corroboram com os de Strommer e Colaboradores (2014) que utilizaram um isolado do extrato de *Actaea racemosa* L. (sinônimo para *C. racemosa*). De acordo com o autor, as moléculas isoladas modularam uma ampla variedade de subtipos de receptores GABA_A, sendo seu perfil aparentemente semelhante aos moduladores de receptores GABA_A, tais como os barbitúricos e os neuroesteróides.

De acordo com a análise dos resultados comportamentais expostos, sugere-se que Cr (50 e 100 mg/Kg/21 d, per os) apresenta uma possível atividade ansiolítica em camundongos, a qual estaria relacionada a modulação de receptores GABA_A.

Posteriormente, para se avaliar uma possível atividade anti- ou pró-depressiva, realizaram modelos clássicos de estresse relacionados a manifestação da depressão em camundongos, através dos testes de suspensão da cauda e nado forçado, respectivamente.

O teste da suspensão da cauda (TSC) e teste do nado forçado (TNF) representam dois modelos de desespero comportamentais, que são amplamente utilizados para a avaliação da atividade antidepressiva (DAVID et al, 2001;.. PORSOLT et al., 1977;.. STERU et al., 1985;.. VENNA et al., 2009). A imobilidade nos dois testes reflete desespero comportamental, que é considerado semelhante à depressão humana. Além disso, muitos antidepressivos promovem os efeitos de uma redução no tempo de imobilidade, em roedores (CONNOR et al., 2000; DETKE et al., 1995).

O teste da suspensão da cauda quando utilizado em camundongos *Swiss*, detecta efeito do tipo antidepressivo promovido pela atuação em diversos sistemas como serotoninérgico,

noradrenérgico e dopaminérgico (BOURIN et al., 2005). O animal é colocado em uma situação inescapável, onde o tempo de imobilidade neste teste avalia o desespero comportamental, que reflete um estado de anedonia, sendo este sensível ao tratamento de antidepressivos como a Imipramina (STERU et al., 1985).

Avaliando a atividade da Cr sobre a depressão experimental em TSC, observou-se que as doses de 100 e 200 mg/Kg alteraram o parâmetro avaliado, aumentando o tempo de imobilidade dos animais, apresentando um possível efeito depressor ou, possivelmente, sedativo nas doses administradas (Figura 20). Quando analisado os resultados no teste do nado forçado, nenhuma das doses testadas de Cr apresentou diferença significativa em relação ao controle (Figura 21), entretanto, pode-se observar que com aumento da dose, houve uma tendência a apresentar efeito depressor e/ou sedativo.

Corroborando com estes dados, os mesmos efeitos também foram vistos em estudos de Strommer e Colaboradores (2014), utilizando o teste de suspensão da cauda, onde foi verificada acentuada inibição motora com doses altas de Ac-SM, sugerindo um efeito sedativo acentuado.

Para verificar se a ação de Cr depressora estaria relacionada com uma atividade sedativo/hipnótico, foi realizado o teste de sono induzido por Pentobarbital. Este estudo permite identificar se determinada droga apresenta efeito sedativo/hipnótico, considerando que duas drogas, quando apresentam o mesmo efeito farmacológico, somam-se.

O Pentobarbital é uma droga capaz de induzir sono em roedores e em humanos por sua ação direta sobre o sítio de ligação dos barbitúricos, localizado especificamente entre as subunidades $\alpha 1$ e $\beta 1$, que compõem o canal de cloreto do complexo receptor GABA_A, aumentando a influência inibitória sobre o sistema nervoso central (GOTTESMANN, 2002; MUROI; CZAJKOWSKI; JACKSON, 2006).

Os resultados de Cr mostraram um aumento na latência do sono nas menores doses (50 e 100 mg/Kg) e aumento do tempo de sono na maior dose (200 mg/Kg) (Figura 22). Estes resultados corroboram com os resultados observados no teste de plus-maze, onde as doses de 50 e 100 mg/Kg apresentaram um efeito ansiolítico e a dose de 200 mg/Kg apresentou um possível efeito depressor no teste da suspensão da cauda. Deste modo, os resultados apontam uma possível ação sedativa dependente da dose utilizada de Cr.

Os estados de ansiedade e os distúrbios do sono representam problemas comuns, e os agentes sedativo/hipnóticos estão entre as drogas mais largamente prescritas em todo o mundo. A inclusão de uma droga na classe dos sedativo/hipnóticos indica que seu principal uso terapêutico consiste em produzir sedação (com alívio concomitante da ansiedade) ou em incentivar o sono. Este estudo mostra que Cr apresenta um efeito ansiolítico sem alterar a

atividade locomotora, com uma ação semelhante ao DZP, as quais, em doses baixas apresentam-se como ansiolíticos e em doses elevadas como sedativo.

Na literatura há relatos de ação antidepressiva de extratos de Cr (NAPPI et al, 2005; OSMERS et al., 2005; BRIESE et al., 2005; OKTEM et al., 2007) os quais diferem dos resultados obtidos no presente estudo. Entretanto, é possível que o extrato utilizado neste estudo, bem como a apresentação do mesmo, possa ter influenciado nos resultados atuais. A maioria dos estudos citados utilizaram isolados específicos do extrato de *C. racemosa*, e empregam outras fontes de extrato *C. racemosa*. O extrato utilizado neste estudo, pode apresentar em maior quantidade compostos que tenham ação antidepressiva, pois em maiores doses apresentou efeito sedativo.

Como o tratamento com Cr mostrou algumas atividades sugestivas de ação a nível de SNC, no presente estudo, também buscou-se avaliar se este fitoterápico seria capaz de promover alterações neuroquímicas em áreas cerebrias.

Dentre as regiões do cérebro, o hipocampo é uma das primeiras a sofrer danos relacionados a distúrbios neurológicos, como encefalite, doença de Alzheimer, epilepsia, estresse, depressão e a ansiedade (MENG et al., 2012; RAMAR; SARASWATHI, 2013; PERSSON et al., 2014). De acordo com Meng e colaboradores (2012), o hipocampo é um dos principais alvos para os hormônios envolvidos no estresse (cortisol, epinefrina e noradrenalina) e seus neurônios podem estar associados a distúrbios de humor, como a depressão. E, além da depressão, o hipocampo possui um papel importante com o comportamento relacionado com a regulação do medo e da ansiedade em roedores (BANNERMAN et al., 2004; PERSSON et al., 2014).

Dentre as alterações ocorrentes no hipocampo durante eventos de estresse, medo, depressão e/ou ansiedade, pode-se citar alterações no metabolismo intracelular a nível transcricional. Entre estes eventos de estresse, o perfil transcriptômico em hipocampo de camundongos submetidos a modelos de ansiedades já se encontra reportado na literatura (VIROK et al., 2011).

Portanto, realizaram-se no presente estudo análises dos efeitos de Cr em relação a possíveis alterações a nível transcricional em hipocampo de camundongos submetidos a modelos de ansiedade, depressão e sedação/hipnose. Adicionalmente, também foram avaliados os efeitos dos fármacos padrões, Imipramina (antidepressivo) e Diazepam (ansiolítico) na expressão de genes de interesse envolvidos na ansiedade e depressão por qPCR.

Análises iniciais por qPCR, quanto a regulação nos genes de controle endógeno Hipoxantina-guanina Fosforibosil Transferase (HPRT) e Peptidilpropil Isomerase A (pPIA),

não indicaram alterações em suas expressões em hipocampo de camundongos submetidos a modulação farmacológica com as drogas utilizadas (Cr, Imipramina e Dizapam) (Figura 25). Portanto, o presente estudo sugere estes genes para realização de normalização de dados de qPCR. Adicionalmente, não foram detectados a presença de possíveis anelamentos inespecíficos em nenhuma das reações realizadas com os oligonucleoídeos (*primers*) utilizados (Figura 24). Desta forma, todos os *primers* utilizados demonstraram especificidade para cada gene analisado.

A expressão de genes corresponde a ativação de circuitos específicos do cérebro relacionados com a percepção e integração de estímulos primários para os sistemas neuroendócrino e autonômico, assim como para as respostas comportamentais (MEDEIROS; REIS; MELLO, 2005). Entre esses genes, pode-se citar o BDNF, c-FOS, c-JUN, EaaT1 e TRKB-F.

De acordo com estudos de Sankova e colaboradores (2006) e Krishnan e Nestler (2008), BDNF está envolvido na neurogênese hipocampal e estudos sugerem que, em humanos, a depressão está associada a uma redução dos níveis desse fator neuroprotetor e alterações na neurogênese hipocampal. Entretanto, em modelos murinos, ainda não se está claro se a neurogênese hipocampal está relacionada a comportamentos de ansiedade e/ou depressão.

O BDNF é um dos genes mais estudados associados à neuroplasticidade, sendo também o fator de crescimento mais produzido e essencial para o SNC. Estudos têm demonstrado que a diminuição da síntese do RNAm de BDNF está associado a problemas de estresse e depressão em pacientes com desordens neurológicas (AUTRY; MONTEGGIA, 2012).

A literatura relata que a administração crônica (20-24 dias) do antidepressivo imipramina resulta no aumento da acetilação hipocampal, a qual está associada a ativação e descondensação da cromatina, na região do promotor do gene BDNF (SANKOVA et al., 2006; KRISHNAN; NESTLER, 2008). Adicionalmente, outros estudos também relatam que administração subcrônica (14 dias) de Imipramina induz a expressão de BDNF em hipocampo de ratos (FURTONATO et al., 2010; RÉUS et al., 2013).

Takano e colaboradores (2012) realizaram estudos *in vitro* com cultura de astrócitos isolados de cérebros de ratos, e mostraram que a imipramina aumentou os níveis de BDNF, sugerindo que esse efeito ocorreria através da ativação do fator de transcrição do elemento de ligação proteico (CREB) via proteína quinase A (PKA) ou via MEK/ERK, uma cadeia de proteínas associadas com a comunicação de sinais desde receptores localizados na superfície celular até o DNA no núcleo.

No presente estudo, os dados de qPCR demonstram a ausência de alterações significantes nos níveis de RNAm de BDNF em hipocampo de animais tratados com imipramina (Figura 25), mostrando inclusive uma tendência a reduzir os níveis de transcripts desse fator neurotrófico. Esta tendência de redução da expressão do gene BDNF pela imipramina pode estar possivelmente associada ao tratamento agudo (1 h) em modelo *in vivo*, o qual pode não ter apresentado o tempo suficiente para aumentar os níveis do RNAm de BDNF em hipocampo de camundongos submetidos a estresse (nado forçado e suspensão da cauda), quando comparado aos outros estudos anteriormente citados, com tratamento crônico (SANKOVA et al., 2006; KRISHNAN; NESTLER, 2008) e subcrônico (FURTONATO et al., 2010; RÉUS et al., 2013).

Entretanto, Ludka e colaboradores (2013), também relataram a ausência do aumento dos níveis proteicos de BDNF em tratamento agudo com Imipramina em camundongos. De acordo com o autor, os efeitos antidepressivos desta droga no nado forçado e teste de suspensão da cauda são devidos a inibição da receptação de noradrenalina e serotonina, e não envolve os receptores de glutamato (NMDA), um dos principais alvos da modulação de BDNF no hipocampo (CALDEIRA et al., 2007). Portanto, o tratamento agudo (1 h) com Imipramina pode ser esperado um efeito negativo sobre os níveis de BDNF (LUDKA et al., 2013).

Adicionalmente, além da imipramina, a literatura descreve o papel de benzodiazepínicos, como o Diazepam, em processos intracelulares e cascatas sinalizatórias envolvidas na regulação sináptica e plasticidade neural (HUOPANIEMI et al., 2004; SARAF et al., 2008; KIM et al., 2009). De acordo com estes estudos, benzodiazepínicos alteram a expressão de genes, dentre os quais está o BDNF, descrito anteriormente (HUOPANIEMI et al., 2004; HUANG; HUNG, 2009). Apesar disso, a análise por qPCR não revelou alterações nos níveis de BDNF em hipocampo de animais tratados com Diazepam (Figura 25). Este resultado corrobora com os obtidos por Licata e colaboradores (2013), o qual relata a ausência de alterações significativas ao analisar os níveis proteicos de BDNF em hipocampo de camundongos tratados com Diazepam por sete dias consecutivos.

Ainda nesse contexto, a expressão do RNAm de um importante receptor de BDNF foi também analisado por qPCR, o gene TRKB. Denominado de receptor tropomiosina quinase B, ou também por receptor tirosina quinase B ou receptor de crescimento neurotrófico tirosina quinase tipo 2, é um receptor para BDNF (NAKAGAWA et al., 1995; SUZUKI et al., 2002). Sua função é mediar os múltiplos efeitos de fatores neurotróficos, como o BDNF, como diferenciação e sobrevivência de células neuronais (RIVERA et al., 2002).

Similarmente ao observado nos resultados de expressão do gene BDNF, os grupos tratados com Cr ou Imipramina não apresentaram diferenças significativas nos níveis de RNAm de TRKB (Figura 26). Entretanto, houve um aumento significativo da expressão deste gene em hipocampo de animais tratados com Diazepam.

A literatura descreve a ação ansiolítica do Diazepam via ação GABA no hipocampo (EGBALI et al., 1997). De acordo com resultados do estudo de Lu e colaboradores (2010), pode haver um envolvimento entre receptores GABA_A e a sinalização BDNF-TRKB. Receptores GABA_A são sítios de ligação para benzodiazepínicos, como o Diazepam (RICHTER et al., 2012), os quais foram descritos mais recentemente como potentes reguladores na liberação de BDNF e, ao mesmo tempo, este está associado com um *feedback* positivo tanto para a síntese de receptores GABA_A, quanto para o aumento da produção de receptores TRKB (MOU; HELDT; RESSLER, 2010; PORSCHER et al., 2011; GONZÁLEZ, 2014).

Os resultados obtidos no presente estudo sugerem que o tratamento com Diazepam estaria realizando um *feedback* positivo indireto na via de TRKB através de sua ligação a receptores GABA_A. Entretanto, não foram observadas alterações nos níveis de BDNF em hipocampo de camundongos tratados com Diazepam. Visto isso, no presente estudo, poderia sugerir a participação de outros ligantes a TRKB, como a proteína tirosina-quinase proto-oncogense (IWASAKI et al., 1998), a proteína citoplasmática NCK2 (SUZUKI et al., 2002), a fosfolipase C γ 2 (MEAKIN et al., 1999; SUZUKI et al., 2002), entre outras, quais poderiam estar envolvidos no mecanismo de ação do Diazepam.

Além do BDNF e seu receptor, TRKB, outros genes estão associados a distúrbios de ansiedade e depressão. Entre estes genes, podem-se citar os genes de ativação imediata, cFOS e cJUN, os quais estão envolvidos em eventos genômicos de controle a alterações no sistema nervoso (SEMBA et al., 1993). De acordo com a literatura, cFOS é um biomarcador que pode ser induzido pela dor, por um estresse de imobilização ou estar associado a comportamentos de ansiedade e/ou depressão (SEMBA et al., 1993; KUNG et al., 2010; PERSSON et al., 2014).

De acordo com a literatura, o tratamento crônico (21 dias) com Imipramina é capaz de modular negativamente sua expressão em hipocampo de ratos (MEDEIROS; REIS; MELLO, 2005). Apesar disso, os resultados obtidos no presente estudo por qPCR revelam que o tratamento, tanto com Imipramina, quanto Cr, não foram capazes de reduzir de forma significativa os níveis de cFOS e cJUN (Figura 26). Por outro lado, ambas as drogas apresentaram uma tendência a diminuir a expressão de cFOS em hipocampo de camundongos. Portanto, a partir destes achados, pode-se sugerir que o tratamento agudo com Imipramina ou tratamento crônico com Cr podem estar agindo negativamente na via de síntese de cFOS em

hipocampo de camundongos. Assim, Cr e Imipramina estariam auxiliando na redução do estresse.

Corroborado com estes resultados, de acordo com McQUADE e colaboradores (2006), camundongos com deficiência de expressão de cFOS no hipocampo demonstram uma melhor resposta contra o estresse e um efeito ansiolítico em modelos do teste *plus maze* e *hole board*.

Ainda no presente estudo, pôde-se observar que o tratamento com Diazepam, apesar de ser um ansiolítico, aumentou significativamente os níveis de RNAm de cFOS no hipocampo (figura 26). Este resultado discorda de achados da literatura que apontam que drogas Benzodiazepínicas podem modular positivamente a expressão de cFOS em áreas cerebrais de ratos, mas não em hipocampo (NILES; SMITH; TENN, 1997). Apesar disso, a literatura também aponta que cFOS, além do envolvimento com o estresse (SEMBA et al., 1993), também é um indicador de atividade neuronal (BULLITT, 1990), o qual está associado a atividade de interação social em camundongos (MIELNIK; HORSFALL; RAMSEY, 2014). De acordo com Mielnik e colaboradores (2014), a administração aguda de Diazepam é capaz de promover a interação social. Segundo o autor, a análise por imunorreatividade revelou um aumento dos níveis de cFOS em áreas cerebrais de camundongos que são expostos a um estímulo social. Desta forma, os resultados obtidos neste estudo podem corroborar com uma possível regulação positiva de Diazepam na via de cFOS, atuando para uma indução da atividade de neurônios hipocampais em camundongos, os quais estariam associados a atividade de interação social.

Adicionalmente, os dados obtidos no presente estudo, sobre os efeitos de Diazepam e Imipramina na transcrição de cFOS, corroboram com a literatura, a qual relata que ambos os fármacos modulam diferencialmente a expressão de RNAm de cFOS em hipocampo de camundongos (MEDEIROS; REIS; MELLO, 2005).

Assim como ocorrido com os resultados da transcrição de cFOS, os efeitos das drogas utilizadas (Imipramina, Diazepam e Cr) agiram de forma similar também na expressão do gene cJUN (Figura 26).

cJUN é uma proteína que, em combinação com cFOS, constitui o fator de transcrição ativador de proteína 1 (AP-1), que por sua vez está envolvida em processos celulares de diferenciação, proliferação e apoptose, e também na regulação da expressão de vários genes envolvidos a respostas a diferentes estímulos, como: citocinas, fatores de crescimento, infecções bacterianas e virais, e estresse (AMEYAR; WISNIEWSKA; WEITZMAN, 2003; HESS; ANGEL; SCHORPP-KISTNER, 2004).

No presente estudo, Imipramina e Cr não apresentaram alterações significativas, apenas uma tendência a reduzir os níveis do RNAm de cJUN em hipocampo de camundongos (Figura

26). Corroborando com estes achados, a literatura relata os efeitos da Imipramina, *in vitro* e *in vivo*, na regulação negativa de cJUN em cultura de linfócitos humanos e também camundongos, descrevendo a ação inibitória deste fármaco sobre a translocação nuclear de cFOS/cJUN (WILKINSON et al., 2009; BRAND et al., 2010; MUKHERJEE et al., 2014). Desta forma, pode-se sugerir que a partir destes achados transcricionais que o tratamento crônico com Cr estaria mimetizando alguns dos achados encontrados no mecanismo de ação do antidepressivo Imipramina, em relação a modulação de cJUN e cFOS.

Em adição, assim como observado na expressão de cFOS, Diazepam também aumentou significativamente os níveis de c-JUN em hipocampo de camundongos (Figura 26). Entretanto, este resultado discorda da literatura, a qual relata que anticonvulsivantes como o Diazepam bloqueiam os níveis de genes de resposta imediata induzido por pilorcapina, dentre os quais, pode-se citar o cJUN (WILLIAMS; JOPE, 1994). Em contrapartida, a literatura relata que Diazepam possui afinidade por receptores muscarínicos e está envolvido na regulação destes (OUCHI et al., 2011), os quais podem mediar, direta ou indiretamente, a indução da expressão tanto de cJUN, quanto de cFOS (NORDGREN; LUNDGREN; KARLÉN, 1987; PELTO-HUIKKO et al., 1995; SURIYO et al., 2008), o que poderia explicar a regulação positiva dos níveis de RNAm de cFOS e cJUN observados em hipocampo de camundongos.

De acordo com a literatura, evidências sugerem que o aumento ou diminuição dos níveis de glutamato, um aminoácido excitatório, em áreas cerebrais estão associados a transtornos de ansiedade e de depressão, respectivamente (POLLACK et al., 2008; LEE et al., 2013).

EaaT1, um Transportador de Glutamato e Aspartato, também conhecido como Transportador de Aminoácidos Excitatórios ou pelas siglas SLC1A3 e GLAST, compõe a família de transportadores de glutamato (EaaT1, 2, 3, 4 e 5), os quais são os principais componentes do ciclo glutamato-glutamina, responsáveis pelo transporte ativo de glutamato sobre a membrana celular e sua remoção do espaço extra para o intracelular (LEHRE et al., 1995; KANAI; HEDIGER, 2004). De acordo com a literatura, a desregulação dos níveis de glutamato/glutamina extra e intracelulares em áreas cerebrais, ocasionado por uma disfunção da recepção de glutamato via EaaT1, pode estar associado com distúrbios neurológicos (KARLSSON et al., 2009; LEE et al., 2013).

De acordo com os dados obtidos da análise por qPCR, o tratamento com Diazepam promoveu um aumento dos níveis de RNAm de EaaT1 em hipocampo de camundongos, enquanto Cr e Imipramina não apresentaram nenhuma alteração significativa (Figura 26). Entretanto, Imipramina revelou uma tendência a reduzir os níveis de RNAm de EaaT1.

Estes resultados podem ser explicados pelo antagonismo realizado pelas drogas benzodiazepínicas a transportadores de glutamato, como a EaaT1, que pode inibir sua atividade enzimática e ocasionar a diminuição do fluxo de aminoácidos excitatórios para o interior dos neurônios para a produção de glutamina (PALMADA et al., 2002). Desta forma, o aumento de aminoácidos excitatórios no espaço extracelular poderia induzir um *feedback* positivo na produção da transportadores EaaT1 em hipocampo de camundongos.

De acordo com Matrisciano e colaboradores (2002), a Imipramina é um clássico antidepressivo tricíclico que induz mudanças adaptativas na expressão e função dos receptores de glutamato em cérebro de ratos. Ainda segundo o autor, o tratamento crônico com Imipramina aumenta a expressão proteica de receptores de glutamina em hipocampo de ratos (MATRISCIANO *et al.*, 2002). Outro estudo, realizado por Michael-Titus e colaboradores (2000), relata que tanto o tratamento crônico, como o agudo com Imipramina são capazes de modular receptores NMDA e reduzir o fluxo de glutamato em córtex pré-frontal de ratos, mas não em hipocampo (NOWAK *et al.*, 1993; PAUL *et al.*, 1993). A interação dos níveis de expressão tanto proteico, quanto a nível transcricional de receptores NMDA e de transportadores EaaT1, é relatada por Lyon e colaboradores (2008). Segundo este estudo, alterações em outro tipo de receptores denominados mGluR, os quais estão envolvidos na regulação de receptores (NMDA) e transportadores (EaaT) de glutamato e (SKEBERDIS et al., 2001; LEA et al., 2002), podem estar agindo em uma modulação positiva para NMDA, induzido por Imipramina, e, ao mesmo tempo, negativa para EaaT1 (LYON et al., 2008). Assim, a partir da análise dos resultados de qPCR, o presente estudo pode sugerir que o antidepressivo Imipramina poderia estar interagindo indiretamente na modulação negativa de transportadores de glutamato, EaaT1, através de receptores mGluR. Estes dados corroboram com os obtidos por Smialowska e colaboradores (2002), o qual relata a influência da Imipramina sobre receptores mGluR do tipo I em hipocampo de ratos.

Em resumo, as análises dos efeitos de Cr por qPCR, no presente estudo, não promoveram alterações significativas nos níveis de expressão dos genes analisados (BDNF, TRKB, cFOS, cJUN e EaaT1). Entretanto, Cr apresentou tendências similares as apresentadas pelo fármaco antidepressivo Imipramina e uma possível modulação na transcrição de cFOS. Adicionalmente, Imipramina e Diazepam demonstraram diferenças na modulação dos genes analisados. Portanto, de acordo com os resultados obtidos, pode-se sugerir que os mecanismos transcriptômicos diferentes dos dois fármacos utilizados podem estar associados a atividade ansiolítica e antidepressiva, respectivamente. Assim, pode-se indicar a utilização destas informações relatadas no presente estudo para auxiliar na elucidação de vias de ação

farmacológicas para o tratamento de distúrbios de humor, bem como para o desenvolvimento de novas estratégias farmacológicas em modelos experimentais *in vivo*.

8 CONCLUSÃO

De acordo com os dados obtidos no presente estudo, Cr promove efeitos ansiolíticos, sedativos e com atividade antioxidante dependentes da dose e áreas cerebrais analisadas, os quais podem estar relacionados a uma ação deste fitoterápico a nível de sistema nervoso central e/ou autônomo. Sua atividade ansiolítica indica uma modulação no sistema GABAérgico via receptores GABA_A, a qual poderia estar relacionada com uma atividade sedativa/hipnótica induzida por uma administração em doses elevadas de Cr. Apesar de sua ação ansiolítica, as análises da expressão de genes indicam um mecanismo de ação, a nível transcricional, possivelmente similar ao fármaco antidepressivo Imipramina. Adicionalmente, a via de administração utilizada, em doses menores que 200 mg/Kg, do fitoterápico Aplause demonstraram uma segurança farmacológica no seu uso, considerando os parâmetros analisados, não promovendo alterações na mucosa gástrica, fisiológicas e locomotoras em camundongos. Portanto, Cr apresenta-se como um agente farmacológico em potencial, com possíveis implicações para a neuropsicofarmacologia.

CAPÍTULO II

***C. racemosa*: Investigação do Efeito Neuroprotetor em Modelo Experimental de Doença de Parkinson em Ratos**

9 INTRODUÇÃO

9.1 Epidemiologia

A Doença de Parkinson (DP) é um dos distúrbios do movimento mais comum do sistema nervoso. Estima-se que afete 6 milhões de pessoas no mundo (BOVÉ; PERIER, 2012), afetando cerca de 1 a 2 % da população acima de 65 anos de idade (SUBRAMANIAN; CHESSELET, 2013). A DP é o segundo distúrbio neurodegenerativo mais comum, estando atrás apenas da Doença de Alzheimer.

Entre as desordens neurodegenerativas, doença de Parkinson (DP) se encontra em segundo lugar, perdendo apenas para a doença de Alzheimer, e afetando milhões de pessoas no mundo, principalmente com idade acima dos 50 anos (TOULOUSE; SULLIVAN, 2008; DOUBLE, 2012). De acordo com Valadas e colaboradores (2014), dada a relevância do processo de envelhecimento na DP e no aumento da expectativa de vida na população mundial, a incidência desta patologia está aumentando drasticamente.

Cerca de 1 milhão de americanos vivem com DP, são diagnosticados por ano aproximadamente 60 mil americanos com a doença, não refletindo o número de casos não detectados com DP. Os Estados Unidos gastam por ano cerca de 25 bilhões de dólares com tratamento da doença. O custo médio para cada pessoa apenas com medicação é de 2.500 dólares por ano. A incidência da DP tem aumentado junto com a idade, os homens apresentam 1,5 vezes a mais de adquirir a doença (PARKINSON'S DISEASE FOUNDATION, 2014)

Na Rússia a prevalência da doença é de 9,95/100.000 habitantes e tem aumentado continuamente com a idade. (WIINTER *et al.*, 2010). Na Suécia a prevalência é de 19,7/100.000 habitantes, não havendo distinção entre os sexos (LINDER; STENLUND; FORSGREN, 2010). No Brasil estima-se que cerca de 200 mil pessoas sofram com a doença de Parkinson (BRASIL, 2014).

9.2 Etiologia/Fisiopatologia

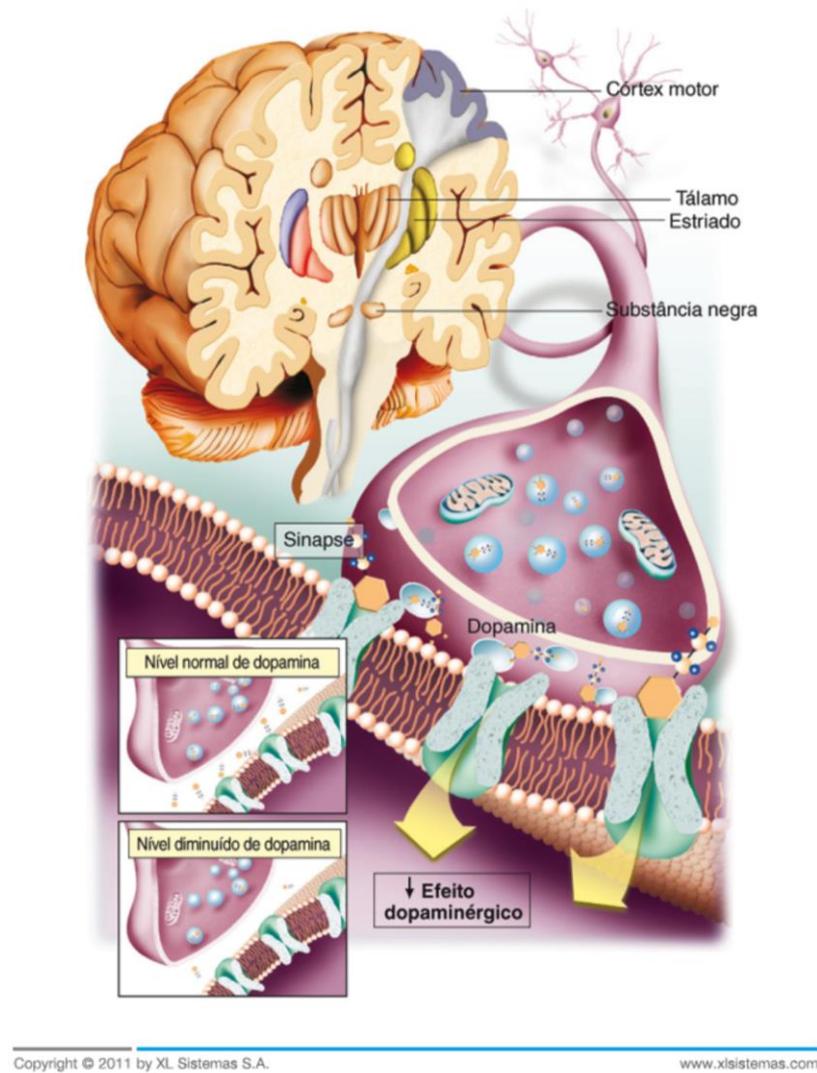
Apesar de décadas de estudo intensivo, a etiologia do mal de Parkinson permanece desconhecida. Ela vem sendo caracterizada como uma doença multifatorial. Muitos especialistas afirmam que a doença é causada por uma combinação de fatores genéticos e ambientais, que podem variar de pessoa para pessoa (SULZER; SURMEIER, 2013; RIHMER; GINDA; DÖME, 2014; CHUKHLOVINA, 2014).

Acredita-se que a perda de dopamina faz com que a desregulação dos circuitos dos gânglios basais resultem em proeminentes sintomas motores clínicos incluindo bradicinesia, tremor em repouso, rigidez e instabilidade postural. Em adição aos sintomas motores, os sintomas não motores, tais como distúrbios do sono, depressão, déficits cognitivos e autonômicos e disfunção sensorial, também estão bem associados à DP (PEREZ; PALMITER, 2005; CHOI *et al.*, 2008; McDOWELL; CHESSELET, 2012) (Figura 27).

Do ponto de vista clínico, a DP caracteriza-se também por insuficiência autonômica. Os sintomas do trato urinário são frequentes, estima-se que de 27% a 78% dos pacientes apresentam distúrbios miccionais. Problema gastrointestinal também é conhecido na doença de Parkinson, sendo largamente o distúrbio da motilidade gastrointestinal. Um dos problemas ocasionados pela motilidade gástrica é a diminuição da frequência das fezes ou constipação. Estima-se que o número de pessoas com DP que apresentem essa dificuldade oscila entre 20% e 77% (WINGE *et al.*, 2006; AL OMRAN; AZIZ, 2014).

Entre um dos principais problemas promovidos por essa doença é a incapacidade severa, a qual pacientes são acometidos após 10 a 15 anos do início desta patologia, e ocasionando um impacto social e financeiro elevado (PARKINSON'S DISEASE FOUNDATION, 2013; AJETUNMOBI *et al.*, 2014). Desta forma, novas abordagens terapêuticas para o tratamento de DP se fazem necessários. Em geral, para o estudo de novas estratégias no tratamento de DP, modelos animais de DP são utilizados por serem capazes de reproduzirem bem os principais achados em pacientes com doença de Parkinson, assim como também no reestabelecimento da performance locomotora (MORIN; JOURDAIN; DI PAOLO, 2014). Apesar disso, os medicamentos atuais para tratamento de DP são aplicados meramente para o alívio sintomático, sendo ineficazes para combater os efeitos deletérios que levam à disfunção neuronal e a morte de neurônios dopaminérgicos (VALADAS; VOS; VERSTREKEN, 2014).

Figura 27 - Via da Dopamina.



Fonte: XL Sistemas S.A.

9.3 O Sistema Nervoso Central: importância de sua integridade funcional

O Sistema nervoso humano contém mais de 100 bilhões de neurônios, onde, em sua maioria, formam milhares de conexões sinápticas, conferindo ao sistema nervoso uma complexidade diferente daquela observada em qualquer outro sistema orgânico. As interações entre os circuitos neuronais medeiam funções que incluem desde reflexos primitivos até a linguagem, o humor, e a memória (HERCULANO-HOUZEL, 2012; HOFMAN, 2014; MATTSON, 2014).

O sistema nervoso pode ser dividido, em nível estrutural e funcional, em componentes periférico e central. O sistema nervoso periférico inclui todos os nervos que seguem o seu

percurso entre o sistema nervoso central e os locais somáticos e viscerais. Enquanto que o sistema nervoso central (SNC) transmite e processa sinais recebidos do sistema nervoso periférico, cujo processamento resulta em respostas que são formuladas e retransmitidas à sua periferia. O SNC é responsável por funções importantes, como: percepção, incluindo processamento sensitivo, auditivo e visual; estado de vigília, linguagem e consciência (GOLAN, 2009).

Desordens no sistema nervoso, denominadas de desordens neurológicas, têm efeitos devastadores e são amplamente distribuídas em toda a população, sendo especialmente prevalente na população mais idosa. Essas desordens neurológicas são multifatoriais e podem ter origem genética, epigenética e/ou serem induzidas por estresses ambientais, injúrias, doenças e/ou processos inflamatórios (SIMONATO *et al.*, 2013). Entre essas desordens neurológicas, podem-se citar os distúrbios comportamentais e as desordens neurodegenerativas (JANN, 2014).

9.4 A Neurodegeneração

Assim como as desordens neurocomportamentais, a degeneração dos tecidos neurais, que pode ser denominada de neurodegeneração, também é considerada um grave problema de saúde de desordem neurológica. Atualmente, com o aumento do envelhecimento da população, inclusive nos países em desenvolvimento como o Brasil, tem recebido cada vez mais atenção especial principalmente devido às consequências geradas, como: declínio em habilidades cognitivas e/ou locomotoras, perda de memória, mudanças de personalidade e manifestações psiquiátricas. Além do envelhecimento, as manifestações da neurodegeneração estão relacionadas a injúrias neurológicas, processos inflamatórios, fatores nutricionais, predisposição genética, estresse, fumo e exposição a toxinas ambientais (HO *et al.*, 2012).

Os estudos de vias moleculares relacionadas a processos neurodegenerativos sejam eles por mecanismos fisiológicos ou patológicos, têm propiciado a validação de genes relacionados a perda de componentes e funções neurais, e contribuído para a elucidação de mecanismos moleculares envolvidos. Através desses estudos têm-se verificado vias similares nos processos neurodegenerativos, os quais estariam associados com as vias de sinalização pró-apoptótica, pró-inflamatória e na modulação de processos relacionados à plasticidade neural (CAO *et al.*, 2010; AENLLE; FOSTER, 2010).

9.4.1 Neurodegeneração e a plasticidade neural

A neuroplasticidade é a habilidade do SNC, ou parte deste, de promover alterações morfofisiológicas e moleculares em respostas às mudanças ambientais. A integridade dos mecanismos neurofisiológicos, hábeis em sofrer adaptações ao meio, representa um papel importante durante toda a vida. Entretanto, a eficiência da plasticidade desses mecanismos pode ser influenciada por fatores genéticos, estilo de vida ou fatores ambientais, os quais podem gerar uma cascata de eventos resultando na diminuição da plasticidade neural. Esse desequilíbrio neuroplástico está relacionado à deterioração cognitiva e desempenha um importante papel na indicação do desenvolvimento de fisiopatologias, em desordens neurogênicas e neurodegenerativas (PASCUAL-LEONE *et al.*, 2011).

Um dos genes mais estudados associados à neuroplasticidade é o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), sendo também o fator de crescimento mais produzido e essencial para o SNC. Estudos têm demonstrado que uma diminuição da síntese do RNAm de BDNF está associado a problemas de estresse e depressão em pacientes com desordens neurológicas (AUTRY; MONTEGGIA, 2012).

Em modelos de indução de doenças degenerativas experimentais, *in vivo* ou *in vitro*, observa-se um aumento da regulação dos níveis de transcritos de BDNF, indicando uma neurogenicidade natural responsiva ou induzida por fármacos (CORVINO *et al.*, 2012). Portanto, o RNAm de BDNF é utilizado como um indicador de atividade de fármacos com ação neuroprotetora e um alvo em potencial para o tratamento de patologias de muitas desordens neurológicas (ZHANG *et al.*, 2012).

9.4.2 Envolvimento de Mediadores Pró-inflamatórios na Neurodegeneração

O processo de inflamação do SNC denomina-se de neuroinflamação, o qual consiste na ativação de mediadores inflamatórios, como: a prostaglandina da série E2 (PGE2) e citocinas, como a interleucina 1 beta (IL1 β) e o fator de necrose tumoral alfa (TNF α). Estudos relatam a neuroinflamação como um componente-chave na indução e progressão de processos degenerativos no SNC. De acordo com estes estudos, a ocorrência da neuroinflamação pode induzir desordens neurodegenerativas no SNC através do aumento da expressão de genes relacionados à produção de mediadores neurotóxicos, os quais contribuem induzindo apoptose de células neuronais (FRANK-CANNON *et al.*, 2009; GUEDES; da SILVA, 2010).

Durante o processo neuroinflamatório, a literatura descreve uma regulação positiva do gene da ciclo-oxigenase tipo 2, a qual possui papel importante na produção de PGE₂, importante mediador inflamatório, e atualmente associada ao desenvolvimento de processos neurodegenerativos (BARTELS; LEENDERS, 2010).

Diversos estudos têm confirmado a regulação de outros genes pró-inflamatórios responsáveis pela presença de citocinas comumente encontrados em processos inflamatórios, como IL1 β e TNF α , ambos atuando como mediadores do processo inflamatório e, em excesso, como fatores neurotóxicos associados com o início de processos de degeneração neural (SEKIYAMA *et al.*, 2012).

Em modelos de neurodegeneração experimental, o aumento de IL1 β e TNF α no SNC implica em mudanças comportamentais, como sonolência, distúrbios de memória, falta de apetite e concentração, redução da atividade locomotora e depressão; modula o mecanismo molecular neurodegenerativo e reduz o processo de neurogênese (KUBERA *et al.*, 2011). Portanto, a expressão de RNA's mensageiros (RNAm) de IL1 β e TNF α em modelos experimentais de avaliação de disfunções comportamentais em ratos, sugerem o envolvimento destes com a ocorrência de danos a células neurais (CASSANO *et al.*, 2006; JARVELA *et al.*, 2011).

De acordo com a literatura, outra via importante para ser investigada e presente em desordens neurodegenerativas é a via do óxido nítrico, a qual desempenha funções importantes no sistema nervoso central tanto em condições fisiológicas quanto em condições patológicas. Nessa via, a proteína óxido nítrico sintase induzida (iNOS) tem sua expressão modulada positivamente durante processos inflamatórios em células neuronais auxiliares responsivas a inflamação, os astrócitos e a microglia, resultando na elevação de óxido nítrico e seus derivados e, quando em excesso nas células neurais, se torna tóxico e induz um processo apoptótico (ZHANG; DAWSON; DAWSON, 2006). Por estes motivos, a análise da via do óxido nítrico se torna uma ferramenta importante para o desenvolvimento de novas estratégias farmacológicas, tanto para o tratamento quanto para o esclarecimento de processos neurodegenerativos, como realizado atualmente em pesquisas relacionadas à doença de Parkinson.

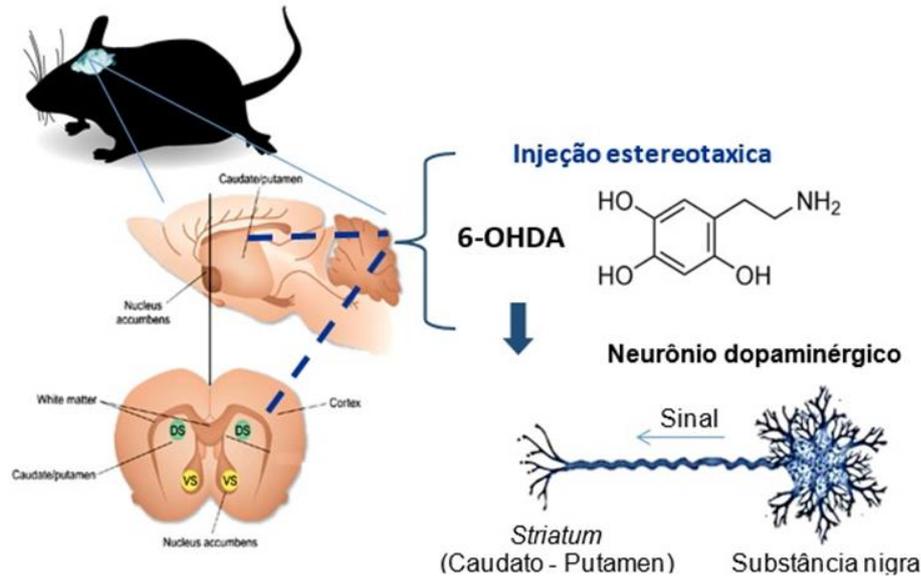
9.4.3 Indução Experimental de Doença de Parkinson como Modelo de Estudo de Processos de Neurodegeneração e Neuroinflamação

O uso de modelos clássicos de estudo de doença de Parkinson em animais, induzidos por neurotoxinas, tem sido crucial para elucidação do entendimento da fisiopatologia da doença e para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas. Dentre esses modelos, o modelo experimental de doença de Parkinson, induzido por 6-hidroxidopamina (6-OHDA) em roedores (DUTY; JENNER, 2011), tem sido amplamente utilizado por sua excelência (BOVÉ; PERIER, 2012).

O procedimento do referido modelo envolve a administração da neurotoxina 6-OHDA por injeção intracraniana, utilizando coordenadas estereotáxicas, direcionadas para o corpo estriado, onde se localizam neurônios dopaminérgicos. Logo após administrada, a neurotoxina induz um processo apoptótico seletivo desses neurônios dopaminérgicos através de mecanismos pró-oxidativos e pró-inflamatórios (DEXTER; JENNER, 2013), resultando nos achados clínicos da doença de Parkinson como: desordens motoras, comportamentais e neuroquímicas (BOVÉ; PERIER, 2012). Nesse modelo, os processos de neurodegeneração e de neuroinflamação ocorrem concomitantemente (MAIA et al., 2012).

Portanto, o referido modelo tem sido utilizado para testar novas estratégias pré-clínicas preventivas e terapêuticas para a doença de Parkinson e para estudos de neuroproteção, com foco na neuroinflamação (BROOM *et al.*, 2011) (Figura 28).

Figura 28 - Modelo de Doença de Parkinson induzido por injeção unilateral de 6-hidroxi dopamina (6-OHDA).



Fonte: Lerchner; La Camera; Richmond. Nature Neuroscience (2007), com adaptações.

9.5 Estrogênios: molécula com potencial neuroprotetor

Apesar dos mecanismos pelos quais o estrogênio induz proteção serem desconhecidos, sabe-se que este exerce vários efeitos relacionados com o seu potencial neuroprotetor: redução do stress oxidativo, inibição dos mecanismos apoptóticos, modulação de atividades celulares e moleculares envolvidos com a sobrevivência neuronal (SHREIHOFER, 2009; TANG *et al.*, 2014; WANG; JIE; DAI, 2014).

Entre as plantas, as quais são descritos fitoestrógenos, moléculas de origem vegetal similares estruturalmente a estrógenos encontrados em animais, pode-se citar a *Cimicifuga racemosa*. A qual são descritos na literatura a presença dos fitoestrógenos em extratos etanólicos isolados da raiz desta planta, principalmente na forma de glicosídeos triterpenos e isoflavonóides (EINBOND *et al.*, 2008). Estes fitoestrógenos isolados de *C. racemosa* são descritos na literatura por estarem relacionados a diversas atividades farmacológicas, como antiviral, anti-inflamatória, anticancerígena, antiosporótica, analgésica, antioxidante, entre outros (ALBERTAZZI, 2002; HAN *et al.*, 2002; EINBOND *et al.*, 2004; VATANPARAST; CHILIBECK, 2007).

Morale e colaboradores (2006) sugerem que a proteção exercida pelos estrogênios está relacionada com a sua ação reguladora na expressão de fatores neurotróficos. Tem sido demonstrado que a administração exógena de estrogênios pode diminuir a extensão da lesão por 6-OHDA em fêmeas ovariectomizadas (MURRAY *et al.*, 2003).

9.6 Hipótese Científica

Visto que o extrato de *Cimicifuga racemosa* é descrito por possuir atividade anti-inflamatória e antioxidante, os quais podem indicar um possível potencial para neuroproteção, o presente estudo hipotetizou que a administração crônica de Cr poderia auxiliar como um agente terapêutico na diminuição das alterações neurocomportamentais e neuroquímicas apresentadas em ratos submetidos ao modelo de doença de Parkinson, induzido por injeção unilateral da neurotoxina 6-OHDA.

10 OBJETIVOS

10.1 Geral

Caracterizar os efeitos do extrato etanólico do rizoma de *Cimicifuga racemosa* frente à degeneração estriatal e alterações comportamentais e neuroquímicas em modelo de Doença de Parkinson, induzido por 6-hidroxiopamina, em ratos.

10.2 Específicos

- Verificar as alterações comportamentais em animais submetidos a lesão com 6-OHDA e tratados com Cr por 21 dias;
- Determinar os efeitos de Cr em alterações neuroquímicas (níveis de nitrito/nitrato, peroxidação lipídica e glutatona reduzida) em ratos submetidos ao modelo de DP induzido por 6-OHDA;
- Investigar Possíveis Mecanismos de ação neuroprotetores *in vitro* induzidos por Cr.
- Analisar a expressão de genes associados a neuroinflamação e neuroproteção envolvidos no mecanismo neurodegenerativo, através da qPCR em corpo estriado (CE) de ratos submetidos ao modelo de Parkinson induzido por 6-OHDA.
- Avaliar os efeitos de Cr sobre alterações nas atividades gastrointestinais, renais e do cólon induzidas por 6-OHDA em ratos.

11 MATERIAIS E MÉTODOS

11.1 Extratos de *Cimicifuga racemosa*

O extrato da planta que foi utilizado nos experimentos deste estudo, foi adquirido em forma de comprimidos revestidos, comercializados pelo laboratório Marjan Farma, com nome comercial Aplause®.

11.2 Animais

Os animais utilizados nos experimentos foram Ratos albinos da espécie *Rattus albinus novergicus* da raça Wistar, adultos, do sexo masculino, pesando aproximadamente 250 a 300g (n=10 *per* grupo), provenientes do Biotério Setorial do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza e os mesmos foram conduzidos a Hospedaria da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará *Campus* de Sobral. Os animais foram divididos aleatoriamente em cinco grupos e mantidos em caixas grandes padrão para ratos, de prolipropileno e com armazenamento máximo de cinco animais por caixa. Os mesmos foram acondicionados à temperatura constante ($24 \pm 1^\circ\text{C}$), com ciclo de claro/escuro de 12 horas, recebendo ração padrão e água *ad libitum*.

11.2.1 Aspectos éticos

Os protocolos experimentais foram elaborados de acordo com o “Guia para Cuidados e Uso de Animais de Laboratório” da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL). Todos os esforços foram feitos para minimizar o número e os sofrimentos dos animais.

O protocolo experimental foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa Animal (CEPA) da UFC sob protocolo NS 23 e os experimentos realizados de acordo com as normas internacionais de uso animais em experimentação.

11.3 Modulação Farmacológica

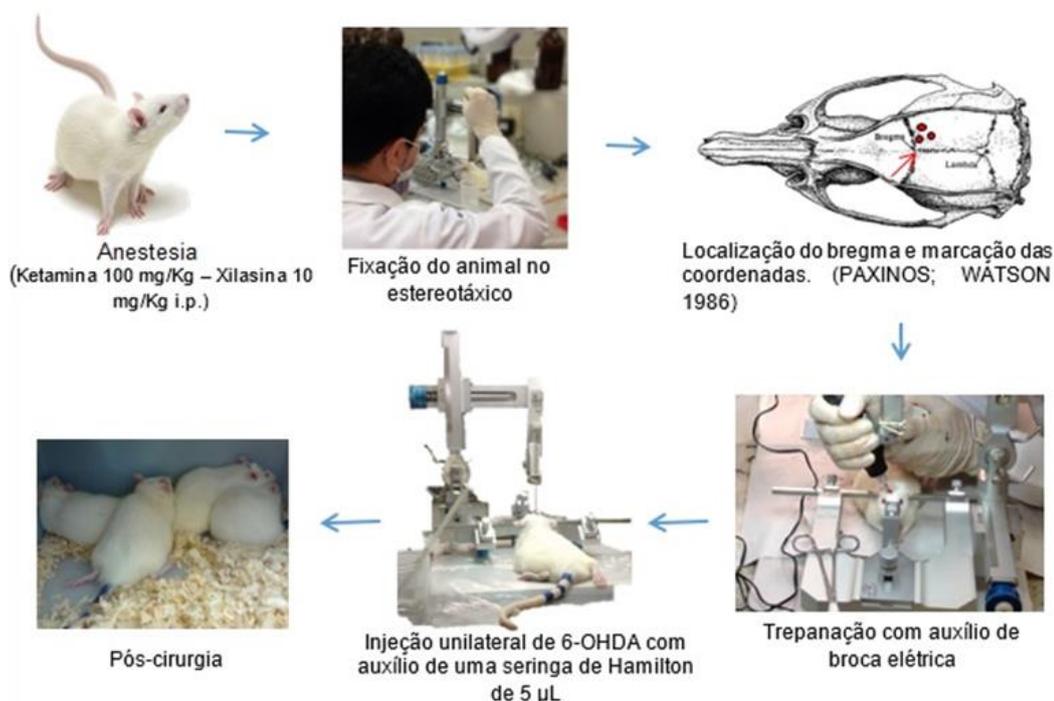
As doses utilizadas neste Capítulo foram de acordo com os dados do fabricante (Marjan Farma), onde recomenda-se uma dose diária de 40 mg/Kg, essa dose foi então convertida para animais (REAGAN-SHAW; NIHAL; AHMAD, 2007) e tomada como base.

11.4 Cirurgia estereotáxica

Os animais foram divididos aleatoriamente em cinco grupos, sendo o grupo 1 animais falso operados (Sham) e os grupos de 2 a 5 foram lesionados com a neurotoxina 6-OHDA, no hemisfério cerebral direito do rato, os grupos 3, 4 e 5 foram tratados com o fitoterápico Cr nas doses de 1,25; 2,5 e 5 mg/Kg, respectivamente. Os animais foram anestesiados com ketamina (100 mg/Kg; i.p.) e xilasina (10 mg/Kg; i.p.), após anestesiado, foi verificado se o animal apresentava qualquer reflexo doloroso. A cabeça do animal foi fixada no aparelho estereotáxico (INSIGHT), através de duas barras de fixação inseridas nos meatos auditivos externos do animal e os dentes incisivos fixados em uma barra de sustentação.

Logo após a fixação do animal, foi feita uma tricotomia e assepsia da região superior da cabeça (álcool 70%). Após a incisão da pele, foi feita a remoção do periósteo, sendo assim exposto o bregma. Após, foram determinadas as coordenadas estereotáxicas (em milímetros), segundo o atlas de Paxinos e Watson (1986), para a realização de 3 orifícios: 1: L: -2.5, AP: +0.5, V: +5.0; 2: L: -3.0, AP: -0.5, V: +6.0; e 3: L: -3.7, AP: -0.9, V: +6.5, em relação ao bregma (PAXINOS E WATSON, 1986), e feita a trepanação com auxílio de uma broca elétrica. Em seguida com uma seringa de Hamilton de 5 µL, os animais receberam injeção intraestriatal de 6-OHDA (21µg) no corpo estriado direito (Figura 29).

Figura 29 - Ilustração do Modelo de Doença de Parkinson induzido por injeção unilateral de 6-hidroxi-dopamina (6-OHDA).



Fonte: Arquivo Pessoal da Autora.

11.5 Preparo da droga e via de administração

O extrato de Cr foi diluído em solução salina (0,9%), obtendo a concentração final de 0,25 mg/mL, 0,5 mg/mL e 1 mg/mL, que correspondem as doses de 1,25; 2,5 e 5 mg/Kg, respectivamente. Todas as doses foram administradas por via oral (*per os*) através de uma sonda gástrica. Os grupos controles receberam veículo (solução salina 0,9%).

11.5.1 Tratamento dos grupos experimentais

Os animais foram tratados com Cr, de forma crônica, nas doses de 1,25; 2,5 e 5 mg/Kg por via oral, durante 21 dias, iniciando duas horas após a cirurgia estereotáxica. Durante todo o período de tratamento os animais foram pesados diariamente e a alimentação e água foram removidas 1 hora antes da administração da droga e recolocadas depois de decorrido 1 hora da gavagem. O volume administrado foi referente ao peso de cada animal.

11.6 Protocolo experimental

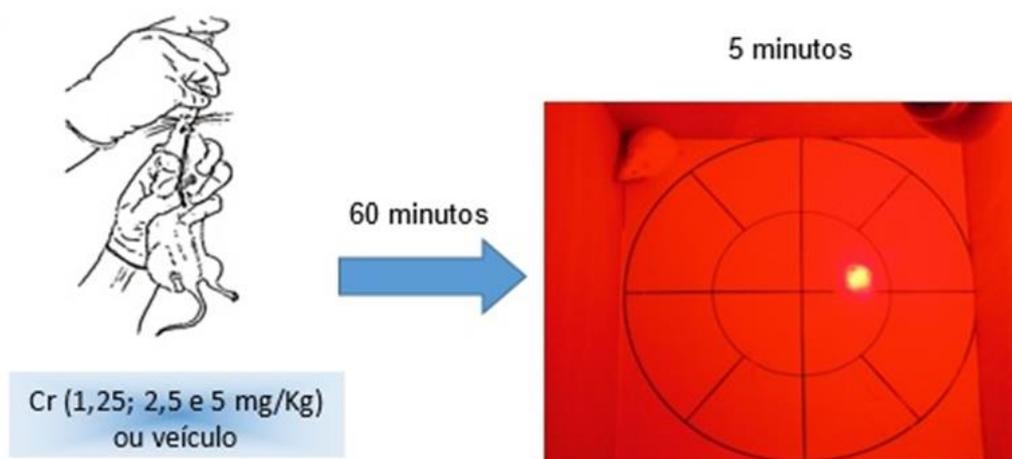
Os experimentos foram realizados durante o dia em dias distintos, onde os animais foram observados em um ambiente fechado, desprovido de barulhos externos e com temperatura constante ($24 \pm 1^\circ\text{C}$). Para o teste de campo aberto foi utilizado uma iluminação de baixa densidade (luz vermelha de 15 W). Os demais ensaios foram realizados com iluminação normal. Em todos os testes com exceção do rotacional, após a observação de cada animal foi utilizado álcool 10% para a remoção de resíduos deixados pelo animal.

11.7 Avaliação da Atividade Locomotora

11.7.1 Teste do Campo Aberto

Este teste, é baseado na metodologia descrita por Sielgel (1946) e validada por Archer (1973), foi utilizado para analisar a atividade exploratória do animal. Os parâmetros avaliados foram: número de cruzamentos com as quatro patas (movimentação espontânea), número de levantamentos sob as patas traseiras (*rearing*) e número de comportamentos de auto-limpeza (*grooming*), adicionalmente o tempo que os animais permaneceram parados, registrados no tempo de 5 minutos. Após 1 hora do tratamento por via oral os animais foram submetidos ao campo aberto (Figura 30) para avaliação dos parâmetros comportamentais. Sendo submetidos ao teste todos os cinco grupos.

Figura 30 - Teste de Campo aberto em ratos.



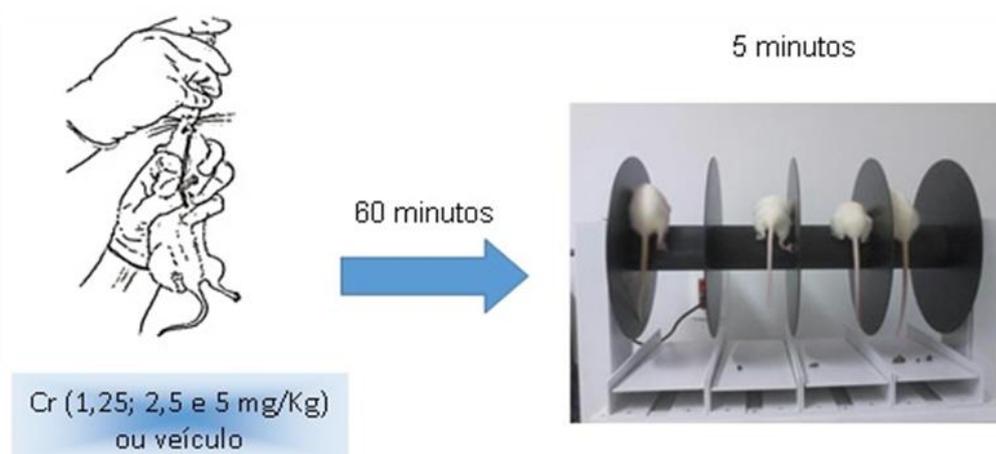
Fonte: Arquivo Pessoal da Autora.

11.8 Avaliação da Atividade Relaxante Muscular

11.8.1 Teste do Rota Rod

O teste do *Rota Rod* mede o efeito do relaxamento muscular ou desordem da coordenação motora ocasionada pela ação de drogas em animais (CARLINI; BURGOS, 1979). Os animais foram colocados com as quatro patas sobre uma barra separada por amplas abas que possibilitam a análise comportamental de cada animal. No modelo para ratos, são quatro divisões, cujo rotor apresenta diâmetro de 7 cm, possibilitando o estudo simultâneo de 4 animais, com uma rotação de 4 a 40 rpm, por um período de 5 minutos, após 1 hora a administração de Cr (1,25; 2,5 e 5 mg/Kg; *per os*) ou veículo (salina 0,9% *per os*). Foram registrados: tempo de latência (segundos), tempo de permanência na barra giratória (segundos), e o número de quedas (DUNHAM; MIYA, 1957) (Figura 31).

Figura 31 - Teste de Rota Rod em ratos

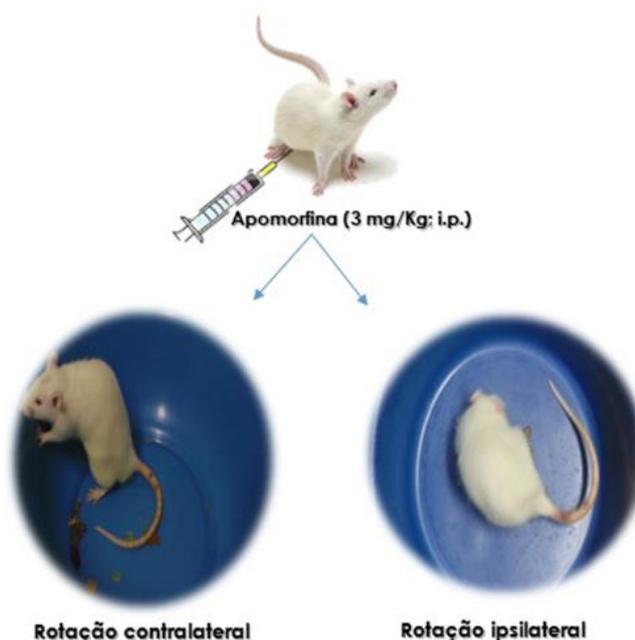


Fonte: Arquivo Pessoal da Autora.

11.9 Teste Rotacional

Os animais foram submetidos ao teste rotacional no 21º dia após a lesão com 6-OHDA. O comportamento rotacional foi determinado através do monitoramento das rotações induzidas pela apomorfina (3 mg/kg, *i.p.*, que induz um comportamento rotacional na direção contrária à lesão (lado contralateral)) e o número de rotações completas em volta do próprio eixo, foi observado durante 60 minutos (KIM *et al*, 1998) (Figura 32).

Figura 32 - Teste rotacional induzido por apomorfina



Fonte: Arquivo Pessoal da Autora. **Legenda:** Ilustração do teste Rotacional induzido por apomorfina (3 mg/Kg, i.p.) utilizado para confirmar processo neurodegenerativo em ratos submetidos ao modelo de DP induzido por injeção unilateral de 6-OHDA.

11.10 Dissecção das Áreas Cerebrais

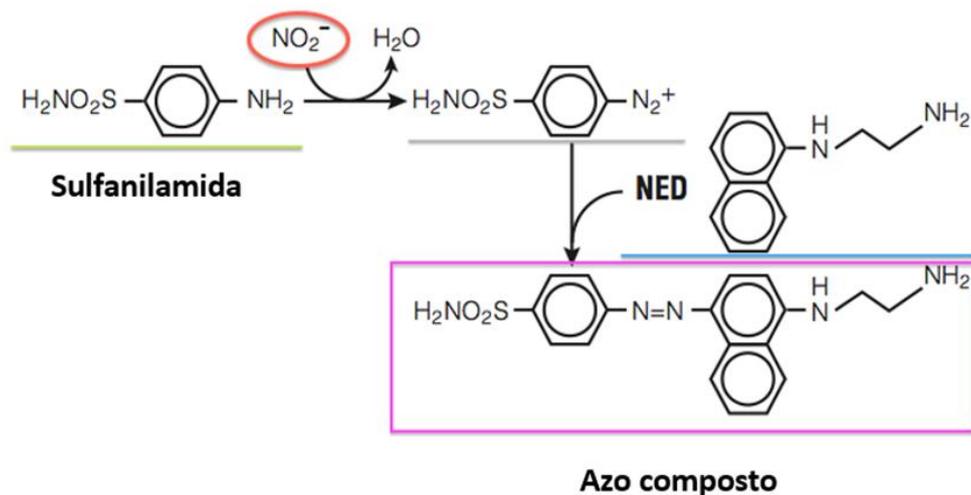
No 22º dia após a cirurgia, os animais foram devidamente sacrificados e, logo em seguida, os encéfalos foram retirados rapidamente e colocados sobre papel alumínio numa placa de Petri com gelo. Em seguida o hipocampo (HC), o corpo estriado (caudado, putâmen e globo pálido) (CE) e o córtex pré-frontal (CFP), foram isolados das estruturas circunjacentes por divulsionamento. Após a dissecção, cada área foi colocada em papel alumínio sobre gelo, pesada e armazenada a -20 °C.

11.11 Análises Neuroquímicas Relacionadas a Neurodegeneração

11.11.1 Determinação da Concentração de Nitrito/Nitrato

Em condições ácidas o nitrito reage com a sulfonilamida formando um composto intermediário, o sal diazônico. Em seguida este sal reage com o N-naftil-etilenodiamina (NEED) formando um azo estável de coloração púrpura, com o pico de absorbância em 540 nm (Figura 33).

Figura 33 - Ilustração da Reação de Griess



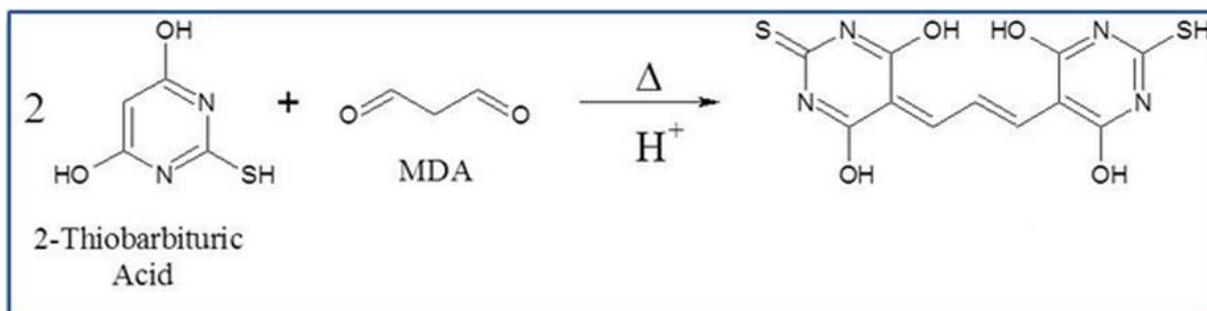
Fonte: Ramos et al (2006) com adaptações.

Para a determinação da produção de Nitrito/Nitrato, primeiramente foi preparado uma curva padrão. Para isso, foram pesados 6,9 mg de NaNO_2 e dissolvidos em 10 mL de água destilada. Em seguida foram feitas as diluições em série (10 e 20x), ficando 1 mM, 100 μM , 10 μM , 5 μM , 2,5 μM , 1,25 μM , 0,625 μM , 0,312 μM . Foi realizada uma equação da reta para o cálculo das concentrações do teste (GREEN; TANNEMBAUN; GOLDMAN, 1981). Para a determinação da concentração de nitrito em cada tecido, foram preparados homogenatos das áreas cerebrais a 10% (w/v) em solução de fosfato de potássio 150 mM, pH 7,4, após centrifugação (11000 g por 15 min à 4°C), os sobrenadantes foram coletados e a produção de óxido nítrico (NO) determinada através da reação de Griess. Uma alíquota de 100 μL do sobrenadante foi incubada com 100 μL do reagente de Griess [sulfanilamida 1% em H_3PO_4 1%/N-(1-naphthyl)-ethylenediamine 0,1%/ H_3PO_4 1%/diluído em água (1:1:1:1)] a temperatura ambiente por 10 minutos. A absorvância foi medida em espectrofotômetro a 540 nm. A concentração de nitrito (μM) foi determinada a partir de uma curva padrão de NaNO_2 .

11.11.2 Determinação da Peroxidação Lipídica (TBARS)

Teste baseado na reação do ácido tiobarbitúrico com os produtos de decomposição dos hidroperóxidos. Um dos principais produtos formados no processo oxidativo é o malonaldeído (Figura 34).

Figura 34 - Ilustração da reação entre ácido tiobarbitúrico com os produtos de decomposição dos hidroperóxidos



Fonte: Eagle Biosciences

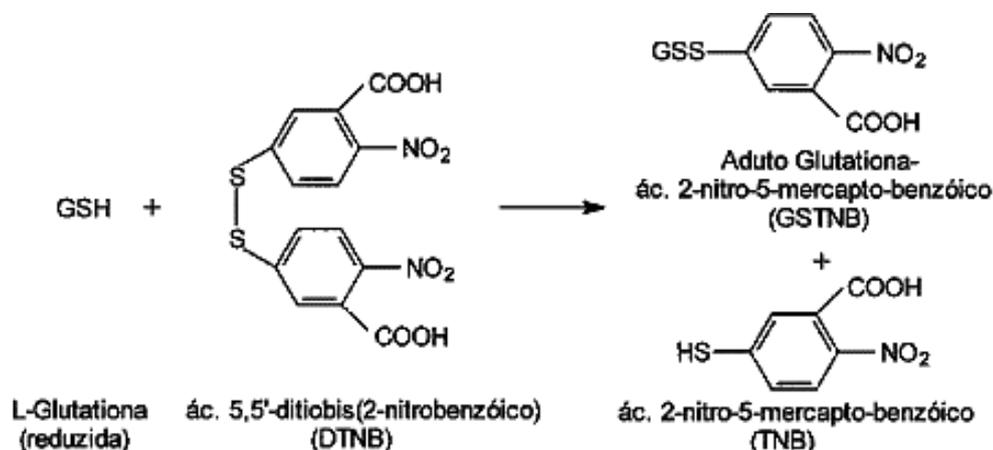
O grau de lipoperoxidação em corpo estriado de ratos foi medido através da determinação das concentrações de substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS), conforme o método de Draper e Hadley (1990). Foram preparados homogenatos da área cerebral a 10% em solução fosfato de potássio 150 mM, pH 7,4. Um volume de 0,25 mL do homogeneizado levado ao banho maria 37 °C por 1 hora e precipitado com 400 μ L de ácido perclórico 35%, após centrifugação (14000 g por 15 min à 4°C), o sobrenadante foi transferido e acrescido 200 μ L de solução de ácido tiobarbitúrico 1,2%. Após banho de água fervente (95-100 °C por 30 min). O conteúdo de TBARS foi determinado em espectrofotômetro a 532 nm. Os resultados foram expressos em micromol de malonildialdeído (MDA) por mg de tecido.

11.11.3 Determinação da Concentração de Glutathiona Reduzida (GSH)

A glutathiona é o maior agente antioxidante produzido por células animais, e o qual pode ser encontrado em sua forma oxidada (GSSG) ou reduzida (GSH) (SCHOLZ *et al.*, 1989; POMPELLA *et al.*, 2003).

A determinação da concentração da GSH baseia-se na reação do reagente de Ellman, o 5,5'-ditiobis (ácido 2-nitrobenzóico) (DTNB) com o tiol livre originando um dissulfeto misto mais ácido 2-nitro-5-tiobenzóico. A medida do produto de reação formado foi feita por leitura da absorbância a 412 nm, a concentração da glutathiona reduzida foi expressa em nanograma de GSH/g de tecido, conforme descrito por Sedlak e Lindsay (1968) (Figura 35).

Figura 35 - Reação entre a glutatona reduzida e DTNB (reagente de Ellman) para a determinação de hidroperóxidos empregando a enzima glutatona reduzida



Fonte: Rover Junior et al (2001)

Para a determinação da concentração de GSH, foi construída uma curva padrão a partir da solução padrão de GSH (1mg/mL), a qual foi preparada em triplicata de soluções a 6,25; 12,5; 25; 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$. O branco foi feito com água destilada (4 mL) e a cada tubo das soluções de GSH foi acrescentado 4 mL de tampão Tris HCl 0,4M (pH 8,9). Para a determinação da equação da curva padrão de GSH, foi adicionado ainda a cada tubo 0,1 mL de DTNB (0,01 M) e, logo após, feita a leitura da absorbância a 412 nm.

Preparou-se o homogenato a 10% em EDTA 0,02 M, em seguida foi retirado 400 μL desse homogenato e adicionado 320 μL de água destilada e mais 80 μL de ácido tricloroacético a 50%. O material foi agitado e centrifugado (3000 g/15 min/4 $^{\circ}\text{C}$). Em seguida foi recolhido 400 μL do sobrenadante e acrescido 800 μL de tampão Tris-HCl 0,4 M, pH 8,9 e mais 20 μL de DTNB 0,01 M. Após 1 minuto da reação foi feita a leitura da coloração em 412 nm, através de um espectrofotômetro. A concentração da glutatona reduzida foi expressa em nanograma de GSH por grama de tecido.

11.12 Análise de Atividade Antioxidante in vitro

11.12.1 Ensaio de Atividade Antioxidante em Mitocôndrias Submetidas a Estresses Oxidativos

Alterações na integridade estrutural e no metabolismo eletroquímico mitocondrial ocorrem como resultado de diversos estados patológicos, como isquemia e exposição a toxinas com a 6-hidroxi dopamina, e podem iniciar processos apoptóticos, resultado na morte celular (MANELLA; PARSONS, 1977; HERTSENS; JACOB, 1987; ZOROV et al., 2000; JUHASZOVA et al., 2004; AON et al., 2006; TOBÓN-VELASCO et al., 2013; LU et al., 2014). Entre estas alterações, podem-se citar o inchamento, alterações no potencial de membrana e a produção de ROS mitocondriais.

11.12.2 Isolamento de Fração Mitocondrial

O isolamento mitocondrial foi realizado como descrito por Schinzel e colaboradores (2005). Inicialmente, cérebros frescos de ratos foram homogeneizados em tampão de lise gelado contendo Mannitol (200 mM), HEPES (80 mM; pH 7.4) e coquetel inibidor de protease. Posteriormente, os homogenatos foram centrifugados (750 rpm por 10 min à 4°C) e o sobrenadante transferido e submetido a centrifugação (8.000 rpm por 20min à 4°C). Os péletes foram lavados 3 vezes, ressuspensos no mesmo tampão de lise descrito anteriormente e submetidos a ultracentrifugação (100.000 rpm por 1 h à 4°C). A concentração proteica da solução com mitocôndrias isoladas foi determinada utilizando o método de Lowry.

11.12.3 Inchamento Mitocondrial

O inchamento mitocondrial foi estimado através de mudanças no espalhamento de luz devido à captação de K⁺. Sabe-se que a entrada de K⁺ na mitocôndria é acompanhada pela entrada de fosfato e água (KOWALTOWSKI et al., 2001). Com isso, pode-se observar uma diminuição do espalhamento de luz de mitocôndrias em suspensão e, assim, pode-se avaliar a atividade do mitoKATP através da medida do espalhamento de luz: quanto maior a diferença de espalhamento de luz, maior será a atividade do canal. Para isso, acompanha-se o inchamento de mitocôndrias isoladas utilizando um fluorímetro (*Thermo Scientific Varioskan*

FLASH), operando em comprimento de excitação e emissão de 520 nm, com slit de 2.5 nm, a 37°C, e sob agitação constante.

Inicialmente, Cr (50; 100 e 200 µg) ou 6-OHDA (20 µg) foi adicionado em um meio de reação com baixa concentração de K⁺ (KCl 100 mM, succinato 1 M, Hepes 5 mM, BSA 0,1 mg/ml, EGTA 100 µM, Mg²⁺ 5 mM, fosfato 2 mM, pH 7,4) e oligomicina 1 µg/ml, em placa de ELISA. Logo em seguida, as mitocôndrias isoladas (aproximadamente 2 mg de proteína/mL) foram incubadas em meio reacional contendo Cr (50; 100 e 200 µg) ou 6-OHDA (20 µg), à temperatura ambiente. Após 50 segundos, a placa foi analisada, como descrito anteriormente, através de espectrofotometria (*Thermo Scientific Varioskan FLASH*). Utilizaram-se como controles mitocôndrias isoladas não submetidas ao meio reacional (controle negativo) e submetidas ao referido meio (controle positivo). O volume em cada poço da placa totalizou um volume final de 200 µL. Todas as reações foram realizadas em quadruplicata. Os resultados foram expressos em porcentagem, em relação ao controle negativo.

11.12.4 Medidas de Potencial de Membrana Mitocondrial

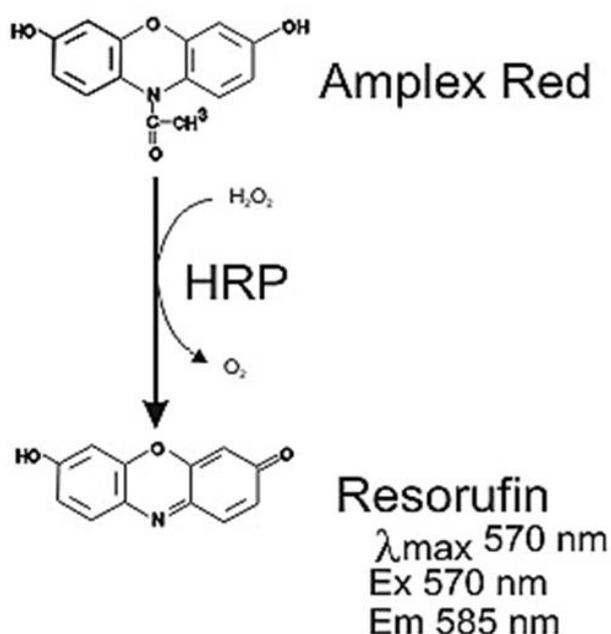
Para estimar o potencial de membrana mitocondrial, foi utilizada a safranina (AKERMAN; WIKSTROM, 1976), um cátion lipofílico que se acumula em membranas mitocondriais proporcionalmente ao potencial de membrana. Assim, o acúmulo de safranina promove uma redução na fluorescência da suspensão.

Inicialmente, Cr (50; 100 e 200 µg) ou 6-OHDA (20 µg) foi adicionado ao meio de reação (KCl 150 mM, succinato 1 M, BSA 0,1 mg/mL, EGTA 100 µM, Mg²⁺ 5 mM, fosfato 2 mM pH 7,4), ATP 1 µM, safranina 5 µM. Logo em seguida, as mitocôndrias isoladas (aproximadamente 2 mg de proteína/mL) foram incubadas em meio reacional contendo Cr (50; 100 e 200 µg) ou 6-OHDA (20 µg), à temperatura ambiente. Após 50 segundos, a placa foi analisada em fluorímetro (*Thermo Scientific Varioskan FLASH*), utilizando como parâmetros 496 nm de excitação e 586 nm de emissão (KOWALTOWSKI *et al.*, 2002). Utilizaram-se como controles mitocôndrias isoladas não submetidas ao meio reacional (controle negativo) e submetidas ao referido meio (controle positivo). O volume em cada poço da placa totalizou um volume final de 200 µL. Todas as reações foram realizadas em quadruplicata. Os resultados foram expressos em porcentagem, em relação ao grupo controle negativo.

11.12.5 Medida de ROS Mitochondrial

A quantidade de ROS gerado pela mitocôndria foi medida através da oxidação de *Amplex Red* 50 μM (Molecular Probes A12222), em presença de horseradish peroxidase (HRP 1 U/mL), a um composto fluorescente denominado resorufina (Figura 36) (MURPHY et al., 2009). Inicialmente, Cr (50; 100 e 200 μg) ou 6-OHDA (20 μg) foi adicionado ao meio de reação (Hepes 5 mM, contendo KCl 150 mM, succinato 5 mM, malato 2 mM, piruvato 2 mM, glutamato 2 mM, BSA 0,1 mg/mL, EGTA 100 μM , Mg^{2+} 5 mM, fosfato 2 mM e oligomicina 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, pH 7,4). Logo em seguida, as mitocôndrias isoladas (aproximadamente 2 mg de proteína /mL) foram incubadas em meio reacional contendo Cr (50; 100 e 200 μg) ou 6-OHDA (20 μg), à temperatura ambiente. As medidas foram feitas utilizando um fluorímetro (Thermo Scientific Varioskan FLASH) operando em comprimentos de excitação e emissão de 563 e 587 nm, respectivamente, em agitação constante a 37°C. Utilizaram-se como controles mitocôndrias isoladas não submetidas ao meio reacional (controle negativo) e submetidas ao referido meio (controle positivo). O volume em cada poço da placa totalizou um volume final de 200 μL . Todas as reações foram realizadas em quadruplicata. Os resultados foram expressos em produção de ROS/ mg de proteína.

Figura 36 - Ilustração da reação da oxidação de *Amplex Red*, em presença de horseradish peroxidase para o fluoróforo resorufina



11.13 Determinação da expressão do RNAm de mediadores Neuroinflamatórios e BDNF através de PCR quantitativa em tempo real (qPCR)

11.13.1 Extração do RNA total

O RNA total foi extraído utilizando TRIzol® (*Life Technologies/Invitrogen*), seguindo as orientações do fabricante baseado no método de isolamento de RNA num único passo desenvolvido por Chomczynski e Sacchi (1987). Para isso, a referida área cerebral foi colocada em homogeneizador manual em presença de 1 mL do reagente TRIzol®. Posteriormente o RNA total foi purificado pelo método guanidino-isotiocianato-fenol-clorofórmio e, após posterior precipitação com uso de iso-propanol (isopropanol ou 2-propanol) e etanol 75 % (diluído com água tratada com DEPC), o RNA total foi mantido (-80 °C) em água ultra pura tratada com DEPC.

11.13.2 Análise Quantitativa e Qualitativa do RNA total

Para testar a eficácia da extração e pureza do RNA total, foi determinada a concentração de RNA total nas amostras por diluição do RNA (fator de diluição conhecido), em espectrofotômetro no comprimento de onda de 260 nm (A_{260}) e 260/280 nm (A_{260}/A_{280}). A qualidade do RNA total foi verificada por eletroforese em gel de agarose 1,2 %, corado com brometo de etídio (10 mg/mL) e visualizado em um equipamento de luz ultravioleta.

11.13.3 Síntese de cDNA

Para a síntese de cDNA (DNA complementar) foi utilizado por reação 1 µg de RNA total, 0,3 µg do *primer* oligo (dT) (*Invitrogen*), 1 µL de dNTPs Mix 10 mM (*Invitrogen*) e água mili-q estéril, que, após misturadas, foram aquecidas a 65 °C por 5 min e depois resfriados em gelo. Posteriormente, foi adicionado 1 µL da *Superscript III reverse transcript* 10000 U (*Invitrogen*) (200U), 2 µL de DTT 0,1 M, 4 µL de *Fist-Strind Buffer 5X* (*Invitrogen*), e a mistura foi incubada no termociclador a 25 °C por 5 min, 50 °C por 60 min, sendo depois aquecido a 70 °C por 15 min e posteriormente armazenado a -20 °C.

11.13.4 Construção dos primers

Os *primers* foram desenhados, com exceção do BDNF, com base em dados obtidos do *Gene Bank* (NCBI), sob junções éxon-éxon, e submetidos à análise através do programa *PrimerBlast* (ROSEN; SKALETSKY, 2000), com especificidade somente para RNAm de *Rattus norvegicus*. Todos foram sintetizados pela Invitrogen (Tabela 5).

Tabela 5 - Descrição dos oligonucleotídeos (*primers*) utilizados na reação de qPCR.

Nome	Sigla	Sequência	Número de Acesso/Fonte	Tamanho do amplicon (pb)	Junção exon/exon (pb)
Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro	BDNF	F 5'- AGGCACTGGAAGCTCGCAATG -3' R 5'- AAGGGCCCCGAACATACGATT -3'	HE <i>et al.</i> , 2013	nd	nd
Subunidade do complexo de NFκB	p65	F 5'- AGCCCCATTAAGTACCACCG -3' R 5'- ATCGCAGTCTCTGTCTAGCG -3'	AJ00242.4 / NCBI	114	-
Óxido nítrico sintase induzida	iNOS	F 5'- GACTGTTTCCTTTCACAGCCC -3' R 5'- AGGGATTCTGGAACATTCTGTG -3'	XM_003750865.1 / NCBI	133	96/97 (<i>reverse</i>)
Interleucina 1 beta	IL1β	R 5'- CCCTGCAGCTGGAGAGTGTGG -3' F 5'- TGTGCTCTGCTTGAGAGGTGCT -3'	NM_031512.2 / NCBI	153	653/654 (<i>foward</i>)
Beta actina	β-Act	F 5'- CCACACCCGCCACCAGTTCG-3' R 5'- GCGAAGCCGGCCTTGACAT-3'	NM_031144.2 / NCBI	87	75/76 (<i>foward</i>)
Alfa tubulina	α-Tub	F 5'- GCCCGTGGCCACTACACCAT -3' R 5'- CCGTGCAGTGGTCAGCCAGC -3'	NM_022298.1 / NCBI	82	441/442 (<i>reverse</i>)
Gliceraldeído-3-fosfodesidrogenase	GAPDH	F 5'- GGGGGCTCTCTGCTCCTCCC -3' R 5'- CGGCCAAATCCGTTACACCG -3'	NM_017008.3 / NCBI	108	99/100 (<i>reverse</i>)

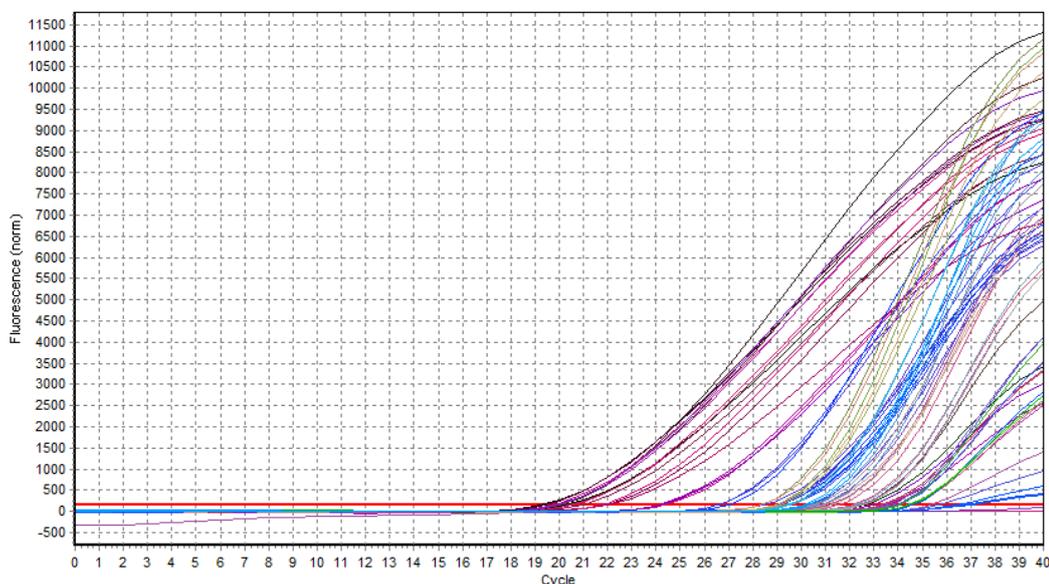
Fonte: Laboratório de Genética Molecular – NUBIS/Sobral.

11.13.5 PCR quantitativa em tempo real (qPCR)

As análises quantitativas da expressão dos genes foram realizadas através de PCR em Tempo Real (qPCR). Para tanto, 0,1 µg do cDNA de cada amostra foi utilizado na reação de qPCR. Além dos ácidos nucleicos, a reação foi composta de iniciadores específicos (300 nm cada) e 10 µL de *2X Power SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems)*, com volume final de 20 µL. A reação de amplificação foi realizada no termociclador *Mastercycler® ep realplex⁴* (Eppendorf) consistindo de desnaturação inicial de 95 °C/10 min seguido de 40 ciclos térmicos de 95 °C por 15 s, 55 °C por 15 s e 60 °C por 20 s. Para análise de prováveis contaminantes foi realizada detecção da presença de produtos (*amplicons*) inespecíficos por análise da curva de *Melting*, constando de temperatura inicial de 55 °C/15 s, seguido por gradiente de 20 min e temperatura final de 95 °C/15 s. Para as análises da expressão dos genes, a amplificação das sequências alvo foram detectadas em tempo real pela emissão de fluoróforos, a qual foi captada pela unidade óptica do aparelho (Figura 37).

As análises dos dados de fluorescência obtidos foram realizadas pelo *Realplex Software 2.2* ®. Todas as reações, tanto dos genes alvo quanto dos controles endógenos, foram realizadas em triplicatas. Os *Cycle threshold* – Ct, utilizados para a normalização de dados e para as análises, foram a média aritmética entre as triplicatas dos genes alvo e controles endógenos. A obtenção da expressão relativa foi realizada pelo método descrito por Livak e Schmittgen (2001), adaptada por Esteves e colaboradores (2013). Para a normalização, foi utilizada a equação $\Delta Ct = Ct (\text{gene alvo}) - Ct (\text{controle endógeno})$. A calibração foi determinada pela fórmula: $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct (\text{amostra}) - \Delta Ct (\text{calibrador})$. A quantificação relativa (valores arbitrários – ESTEVES *et al.*, 2013) foi obtida pela fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001 adaptada por ESTEVES *et al.*, 2013). Utilizou-se o grupo Salina como calibrador. A expressão dos genes constitutivos HPRT e pPIA foram utilizados como controle endógeno para a normalização dos referidos dados.

Figura 37 - Ilustração da Detecção da Emissão do Fluoróforo SYBRGreen® em Tempo Real por qPCR



Fonte: Imagem do *Realplex Software 2.2* ® do arquivo pessoal da Autora.

11.14 Esvaziamento Gástrico e Trânsito Gastrintestinal

Para avaliar a taxa de esvaziamento gástrico (EG) e trânsito gastrintestinal (TGI) foi utilizada a técnica de retenção fracional de corante não absorvível ou secretado pelo trato gastrintestinal, originalmente descrita por Reynel e Spray (1956).

Os animais foram mantidos em gaiolas metabólicas com jejum alimentar de 12h, e mantida água glicosada a 5%. Os animais receberam com auxílio de uma sonda gástrica (por gavagem), 1,5 mL de uma refeição teste (vermelho fenol (VF) - 0,5 mg/ml em glicose a 5%).

Decorridos 20 minutos após a administração do VF, os animais sacrificados por meio de guilhotina e, então, submetidos à laparotomia mediana com exposição das vísceras abdominais (estômago e intestino delgado). Para tanto e de forma delicada, foram realizadas ligaduras obstrutivas, primeiramente, ao nível da região pilórica, com intuito de não mais permitir a passagem da refeição teste para o duodeno, seguido por uma segunda ligadura do esôfago abdominal ao nível da cárdia. Após as duas primeiras ligaduras, o estômago e o intestino delgado foram, então, cuidadosamente removidos (exérese) e posteriormente estendidos sobre uma prancha, com intuito de determinar sua extensão, mensurado em cm. Finalmente, uma terceira ligadura foi colocada no íleo terminal, ao nível da junção íleocecal. As vísceras expostas foram divididas em quatro segmentos consecutivos: Estômago (Et),

Intestino proximal (P – inicial), Intestino medial (M – intermediário) e Intestino distal (D – final). O intestino foi dividido nas seguintes proporções: P (40%), M (30%) e D (30%).

Para determinação dos volumes das vísceras, foi utilizada a diferença volumétrica, como mostra a fórmula abaixo:

$$\text{VOL. (v)} = \text{VOL. (t)} - \text{VOL. (p)}$$

Onde:

Vol. (v) = Volume visceral.

Vol. (p) = Volume da proveta contendo 100ml.

Vol. (t) = Volume total [Vol. (p) + víscera].

Após determinação dos volumes, os segmentos viscerais juntamente com o NaOH, foram fragmentados através de homogeneização por 30 segundos utilizando um mixer elétrico. Após tal processo, o homogeneizado foi então, mantido em repouso por 20 min à temperatura ambiente. Posteriormente foram retirados 10 mL do sobrenadante para uma primeira centrifugação à 2800 rpm/10 min. Dessa primeira centrifugação, foram retirados 5 mL para que as proteínas contidas nesse volume fossem precipitadas em 0,5 mL de ácido tricloroacético 20% (TCA) e, posteriormente, centrifugadas por 2800 rpm/20 min. Por fim, 3 mL desse sobrenadante foram adicionados a 4 mL de NaOH a 0,5 N para determinação, por espectrofotometria, da absorbância (ABS) das amostras em 560 nm.

A retenção percentual (%) da refeição teste (vermelho-fenol + glicose 5%) em cada segmento foi calculada pela seguinte equação:

$$\text{Retenção no segmento X} = \frac{\text{Quantidade de VF recuperado no segmento X}}{\Sigma \text{ da quantidade de VF recuperada nos segmentos do TGI}}$$

Onde:

Σ = Somatório

VF = Vermelho de fenol.

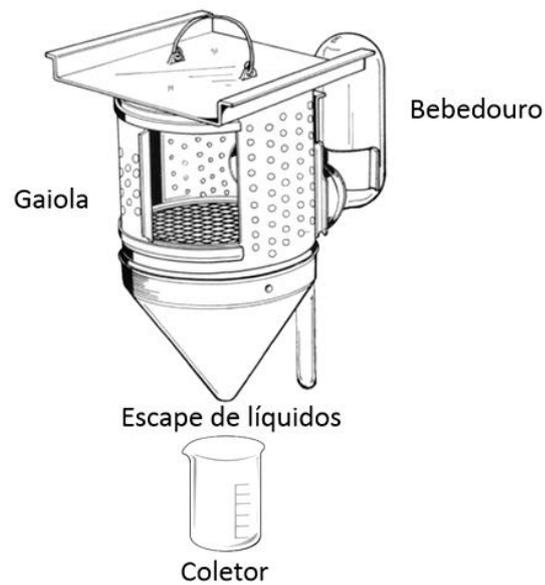
x = Segmento em questão

A recuperação fracional do corante nos quatro segmentos do TGI permitiu-nos estimar a progressão do marcador ao longo do TGI, que identificamos como índice do trânsito gastrointestinal. No caso em particular do estômago a recuperação fracional do corante neste segmento serviu como índice de retenção gástrica.

11.15 Análise da Atividade Renal e do Cólon

No 21º dia após os testes comportamentais, os animais foram relocados e mantidos em gaiolas metabólicas (Figura 38), sem comida, mas com água *ad libitum*, para análise de possíveis alterações fisiológicas, através da quantidade total de urina (μL) e fezes excretadas durante um período de 12 horas (20 h/ pm – 8 h/ am).

Figura 38 - Gaiola Metabólica para Ratos



Fonte: Insight. **Legenda:** Ilustração de equipamento utilizado para análise da Atividade Renal.

12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os valores numéricos foram apresentados como erro padrão da média (EPM) e submetidos a análises de diferenças estatísticas através da análise de variância (*One-way* ou *Two-way* ANOVA), seguido pelo teste de Comparações Múltiplas de Bonferroni. Consideraram-se os valores com $P < 0,05$ como estatisticamente significativos. As análises estatísticas foram realizadas no programa GraphPad Prism, versão 4.0, (San Diego, CA, EUA). Adicionalmente, todos os experimentos foram realizados por observadores “cegos”.

13 RESULTADOS

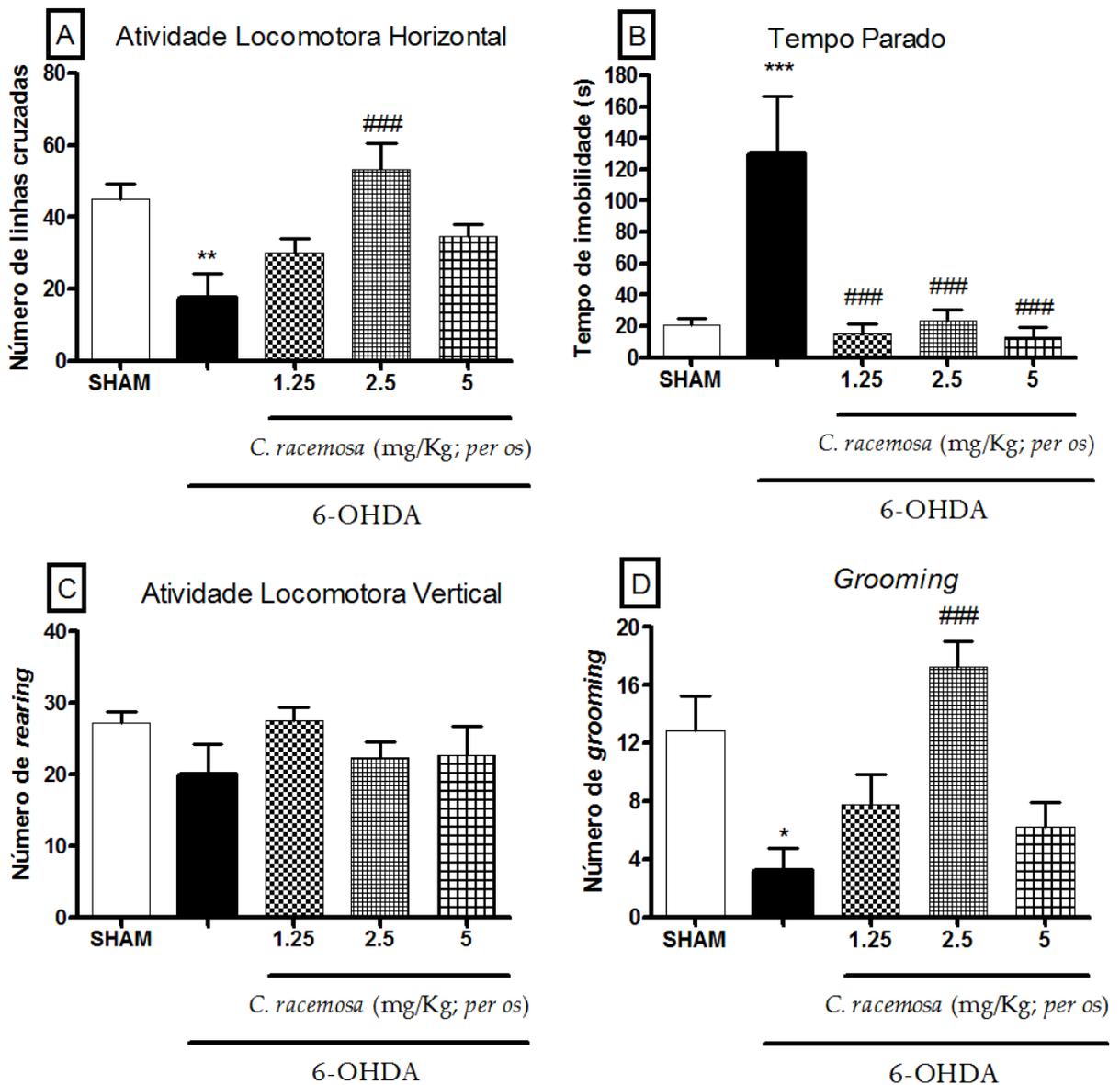
13.1 Avaliação da Atividade Locomotora

13.1.1 Teste do Campo Aberto (*Open Field test*)

No teste de campo aberto, pôde-se notar que os animais lesionados com 6-OHDA apresentaram diminuição da atividade locomotora horizontal em 62% (cruzamento: $17,0 \pm 6,6$ número de linhas cruzadas) (Figura 39 A), como também no aumento de 540% do tempo de imobilidade ($130,6 \pm 36,1$ segundos) (Figura 39 B) e também uma redução de 75% no número de auto-limpeza (*grooming*: $3,2 \pm 1,5$ número de vezes executado) (Figura 39 D), em relação ao grupo Sham (cruzamento: $45,0 \pm 4,3$ número de linhas cruzadas; tempo de imobilidade: $20,4 \pm 4,5$ s; e *grooming*: $12,9 \pm 2,4$ número de vezes executado).

Animais tratados com Cr, na dose de 2,5 mg/Kg diferiu significativamente, em relação ao grupo 6-OHDA, aumentando a atividade horizontal (Figura 39 A) e auto-limpeza (*grooming*) (Figura 39 D) em 214% e 440%, respectivamente (cruzamento: $53,3 \pm 7,1$ número de linhas cruzadas; e *grooming*: $17,3 \pm 1,8$ número de vezes executado). Por outro lado, todas as doses de Cr (1,25; 2,5 e 5 mg/Kg) diminuíram o tempo de imobilidade em 88%, 82% e 90%, respectivamente (1,25 mg/Kg: $15,2 \pm 6,5$ s; 2,5 mg/Kg: $23,4 \pm 7,1$ s; e 5 mg/Kg: $13,1 \pm 6,2$ s), quando comparadas ao grupo 6-OHDA (Figura 39 B).

Adicionalmente, a atividade vertical (*rearing*) não diferiu em nenhum dos grupos analisados (Figura 39 C).

Figura 39 - Análise da atividade motora no Teste de Campo Aberto (*Open field test*)

Fonte: Arquivo pessoal da Autora. **Legenda:** (A) Número de linhas cruzadas (Atividade Locomotora Horizontal), (B) Tempo de imobilidade, (C) *Rearing* (Atividade Locomotora Vertical) e (D) *Grooming*. Os ratos ($n=10$ per grupo, machos, pesando aproximadamente 250-300 g) foram tratados com Cr (1,25; 2,5 e 5 mg/Kg per os) ou Salina (0,9%, per os) durante 21 dias após serem submetidos a cirurgia estereotáxica. No 21º dia, após 1h do tratamento, os animais foram observados durante 5 min em campo aberto (cruzamentos, *rearing*, *grooming* e tempo de imobilidade). Os dados estão expressos em médias \pm EPM. *One-way* ANOVA, Bonferroni. *, ** e *** indicam diferenças $P<0,05$, $P<0,01$ e $P<0,001$, respectivamente em relação ao Sham ### indica diferença $P<0,001$, em relação ao grupo 6-OHDA.

13.2 Avaliação da Atividade Relaxante Muscular

13.2.1 Teste do Rota Rod

A latência, o número de quedas e o tempo de permanência, foram os parâmetros avaliados no tempo de 5 minutos na barra giratória nas rotações de 4 a 40 rpm.

O grupo 6-OHDA reduziu o tempo de latência em 52% ($52,6 \pm 4,3$ s), assim como o tempo de permanência em 41% ($87,4 \pm 8,0$ s) e aumentou o número de quedas ($5,4 \pm 0,2$) na barra giratória em 28%, em relação ao Sham (tempo de latência: $109,6 \pm 8,1$, segundos; tempo de permanência: $149,2 \pm 6,5$ s; quedas: $4,2 \pm 0,1$).

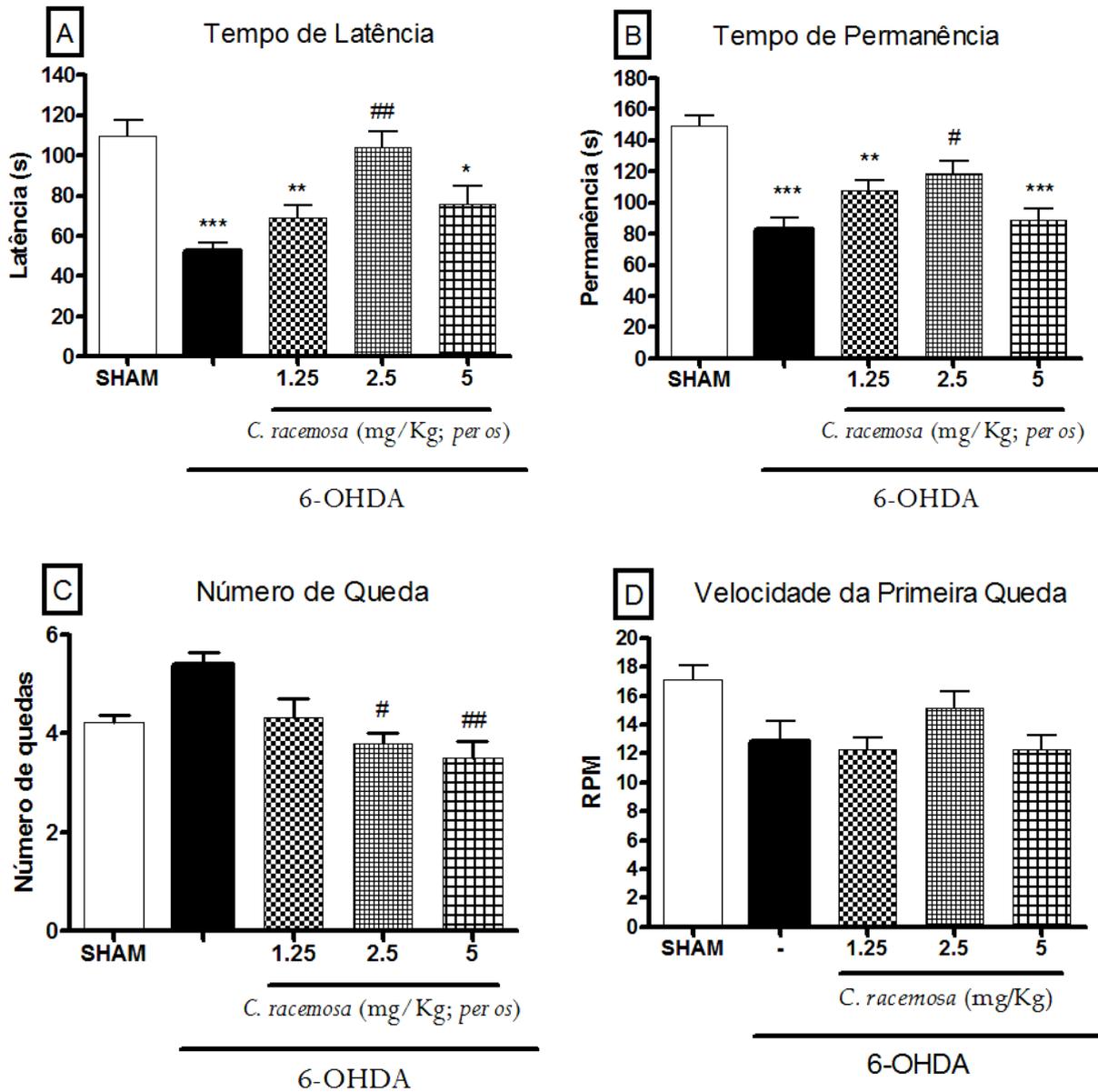
Os animais submetidos ao tratamento de Cr ($2,5$ mg/Kg) aumentaram o tempo de latência em 98% ($104,1 \pm 8,1$ s) e o tempo de permanência em 36% ($118,9 \pm 7,9$ s), e apresentaram uma redução no número de quedas em 10% ($3,8 \pm 0,2$), quando submetidos a barra giratória, comparando-os com o grupo 6-OHDA (Figura 40).

13.3 Teste Rotacional

O teste de rotação induzido por apomorfina foi feito no 21º dia de tratamento, para quantificar a atividade neurodegenerativa induzida pela neurotoxina (6-OHDA).

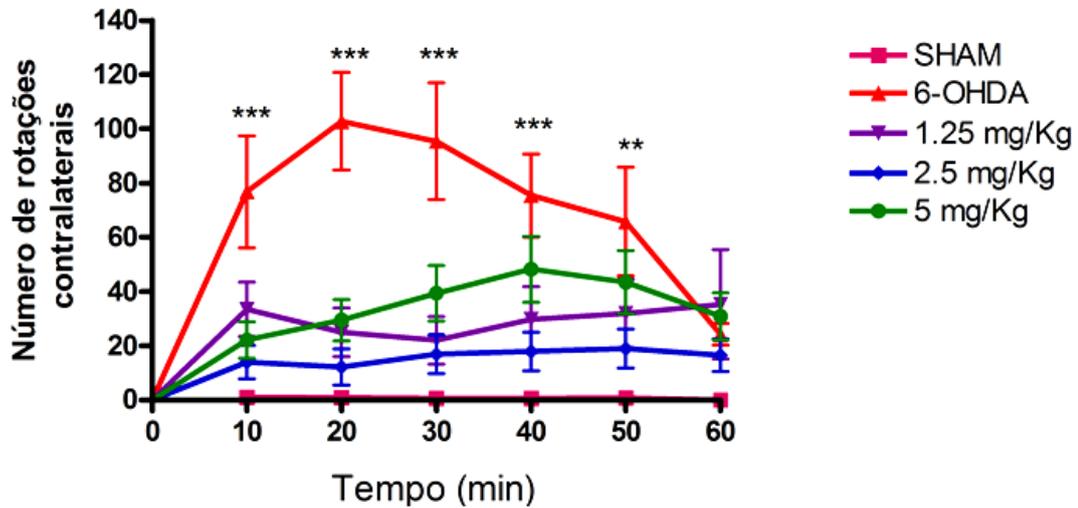
Verificou-se a análise temporal das rotações contralaterais, onde observou-se o pico de rotações a cada 10 min, para cada grupo (Figura 41), assim como o número de rotações totais durante 60 minutos (Figura 42).

Os resultados indicaram um processo de degeneração nos neurônios dopaminérgicos, induzido por 6-OHDA, os quais são responsáveis pela ação motora, onde os animais apresentaram rotações contralaterais significativamente elevadas ($P < 0,001$), totalizando $414,8 \pm 69,5$ rotações contralaterais em relação ao grupo Sham ($4,3 \pm 3,3$ rotações contralaterais) (Figura 42). Por outro lado, animais tratados com Cr $2,5$ mg/Kg, reduziram significativamente ($P < 0,001$) o número de rotações em 82%, em relação ao grupo 6-OHDA.

Figura 40 - Análise da Atividade Relaxante Muscular no Teste de *Rota rod*

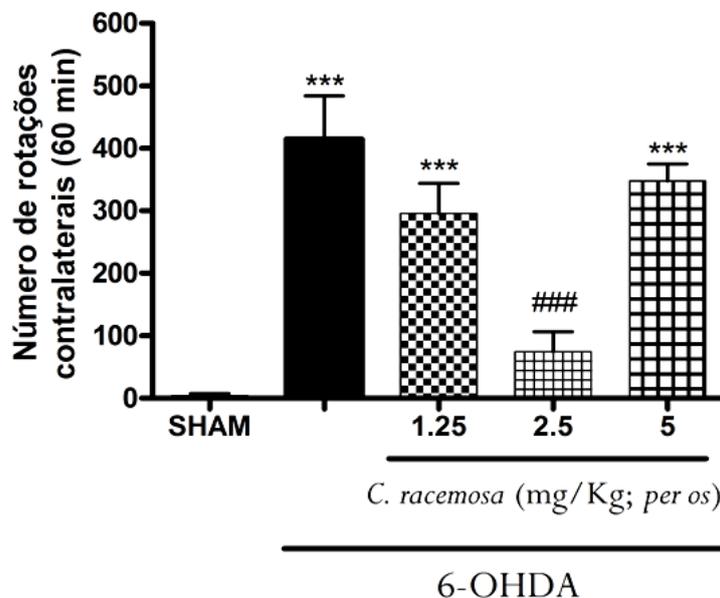
Fonte: Arquivo pessoal da Autora. **Legenda:** (A) Tempo de Latência, (B) Tempo de Permanência, (C) Número de Quedas e (D) Velocidade da primeira queda. Os ratos ($n=10$ per grupo, machos, pesando aproximadamente 250-300 g) foram tratados com Cr (1,25; 2,5 e 5 mg/Kg per os) ou Salina (0,9%, per os) durante 21 dias após serem submetidos a cirurgia estereotáxica. No 21º dia, após 1h do tratamento, os animais foram observados durante 5 min em barra giratória. Os dados estão expressos em médias \pm EPM. *One-way* ANOVA, Bonferroni. *, ** e *** indicam diferenças $P<0,05$, $P<0,01$ e $P<0,001$, respectivamente em relação ao Sham. # e ## indicam diferenças $P<0,05$ e $P<0,01$, respectivamente em relação ao grupo 6-OHDA.

Figura 41 - Análise Temporal da Variação Rotacional.



Fonte: Arquivo pessoal da Autora. **Legenda:** Os ratos ($n=10$ per grupo, machos, pesando aproximadamente 250-300 g) foram tratados com Cr (1,25; 2,5 e 5 mg/Kg per os) ou Salina (0,9%, per os) durante 21 dias após serem submetidos a cirurgia estereotáxica. No 21º dia, após 1h do tratamento, os animais foram observados durante 60 min. Os dados estão expressos em médias \pm EPM. *One-wa* ANOVA, Bonferroni. ** e *** indicam diferenças $P<0,01$ e $P<0,001$, respectivamente, em relação ao Sham. ### indica diferença $P<0,001$, em relação ao grupo 6-OHDA.

Figura 42 - Análise do Comportamento Rotacional Induzido por Apomorfina



Fonte: Arquivo pessoal da Autora. **Legenda:** Os ratos ($n=10$ per grupo, machos, pesando aproximadamente 250-300 g) foram tratados com Cr (1,25; 2,5 e 5 mg/Kg per os) ou Salina (0,9%, per os) durante 21 dias após serem submetidos a cirurgia estereotáxica. No 21º dia, após 1h do tratamento, os animais foram observados durante 60 min. Os dados estão expressos em médias \pm EPM. *One-wa* ANOVA, Bonferroni. *** indica diferença $P<0,001$, respectivamente, em relação ao Sham. ### indica diferença $P<0,001$, em relação ao grupo 6-OHDA.

13.4 Análises Neuroquímicas Relacionadas a Neurodegeneração

13.4.1 Determinação da Concentração de Nitrito/Nitrato

As análises neuroquímicas das áreas cerebrais de ratos submetidos ao modelo de Parkinson induzido por 6-OHDA, mostraram que concentrações de nitrito/nitrato foram significativamente ($P < 0,001$) aumentadas no hipocampo, corpo estriado (ipsilateral) e córtex pré-frontal em aproximadamente 317%, 267% e 45%, respectivamente (Hipocampo: $22,1 \pm 2,0$; CE (ipsi): $22,8 \pm 2,2$; Córtex pré-frontal: $11,86 \pm 0,8$ $\mu\text{Mol/mg}$ de tecido, respectivamente), de animais do grupo 6-OHDA em relação ao grupo Sham (Hipocampo: $5,3 \pm 1,2$; CE (ipsi): $6,21 \pm 1,8$; Córtex pré-frontal: $8,2 \pm 0,7$ $\mu\text{Mol/mg}$ de tecido, respectivamente) (Figura 43).

Entretanto, quando os animais foram submetidos ao tratamento com Cr, nas doses de 1,25; 2,5 e 5 mg/Kg, houve uma redução da concentração de nitrito/nitrato em todas as áreas cerebrais analisadas (Cr 1,25 mg/Kg – Hipocampo (66%): $7,53 \pm 0,3$; CE (Ipsi) (48%): $11,8 \pm 2,0$; Córtex Pré-frontal (51%): $5,8 \pm 0,7$ $\mu\text{Mol/mg}$ de tecido; Cr 2,5 mg/Kg – Hipocampo (51%): $10,8 \pm 1,3$; CE (Ipsi) (37%): $14,4 \pm 1,3$; Córtex Pré-frontal (33%): $8,0 \pm 0,9$ $\mu\text{Mol/mg}$ de tecido; Cr 5 mg/Kg – Hipocampo (61%): $8,7 \pm 1,9$; CE (Ipsi) (49%): $11,7 \pm 1,0$; Córtex pré-frontal (69%): $3,7 \pm 0,7$ $\mu\text{Mol/mg}$ de tecido, respectivamente), quando comparados ao grupo 6-OHDA .

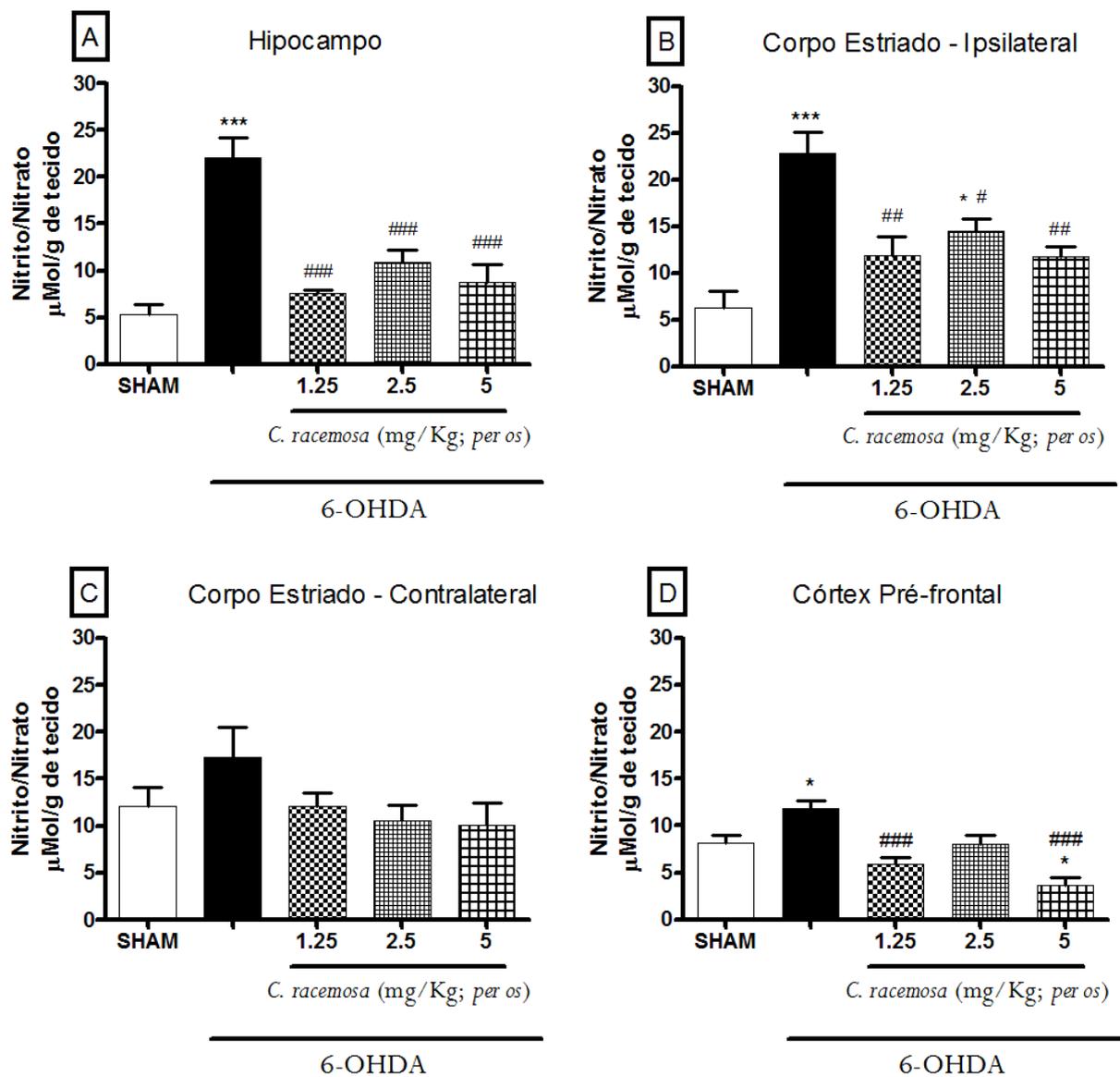
As análises não demonstraram diferença significativa com os grupos tratados com Cr em relação ao grupo Sham, com exceção da dose de 5 mg/Kg, no córtex pré-frontal, que houve uma diminuição de 55% da concentração de nitrito/nitrato.

13.4.2 Determinação da Peroxidação Lipídica (TBARS)

Para verificar uma possível ação antioxidante, utilizou-se o método de TBARS nas amostras coletadas do cérebro. Os resultados mostraram que a neurotoxina (6-OHDA) promoveu um aumento ($P < 0,001$) da concentração de malonildialdeído (MDA), um dos principais produtos do processo de peroxidação lipídica, em aproximadamente 360%, 280% e 63% no hipocampo, CE (ipsi) e córtex pré-frontal, respectivamente, em relação ao Sham. Entretanto, Cr 1,25 e 2,5 mg/Kg, reduziram significativamente ($P < 0,001$ e $P < 0,01$, respectivamente) MDA no hipocampo (70%, 48% e 61%, respectivamente) e no corpo estriado ipsilateral (48%, 39% e 48%, respectivamente), em relação ao grupo 6-OHDA.

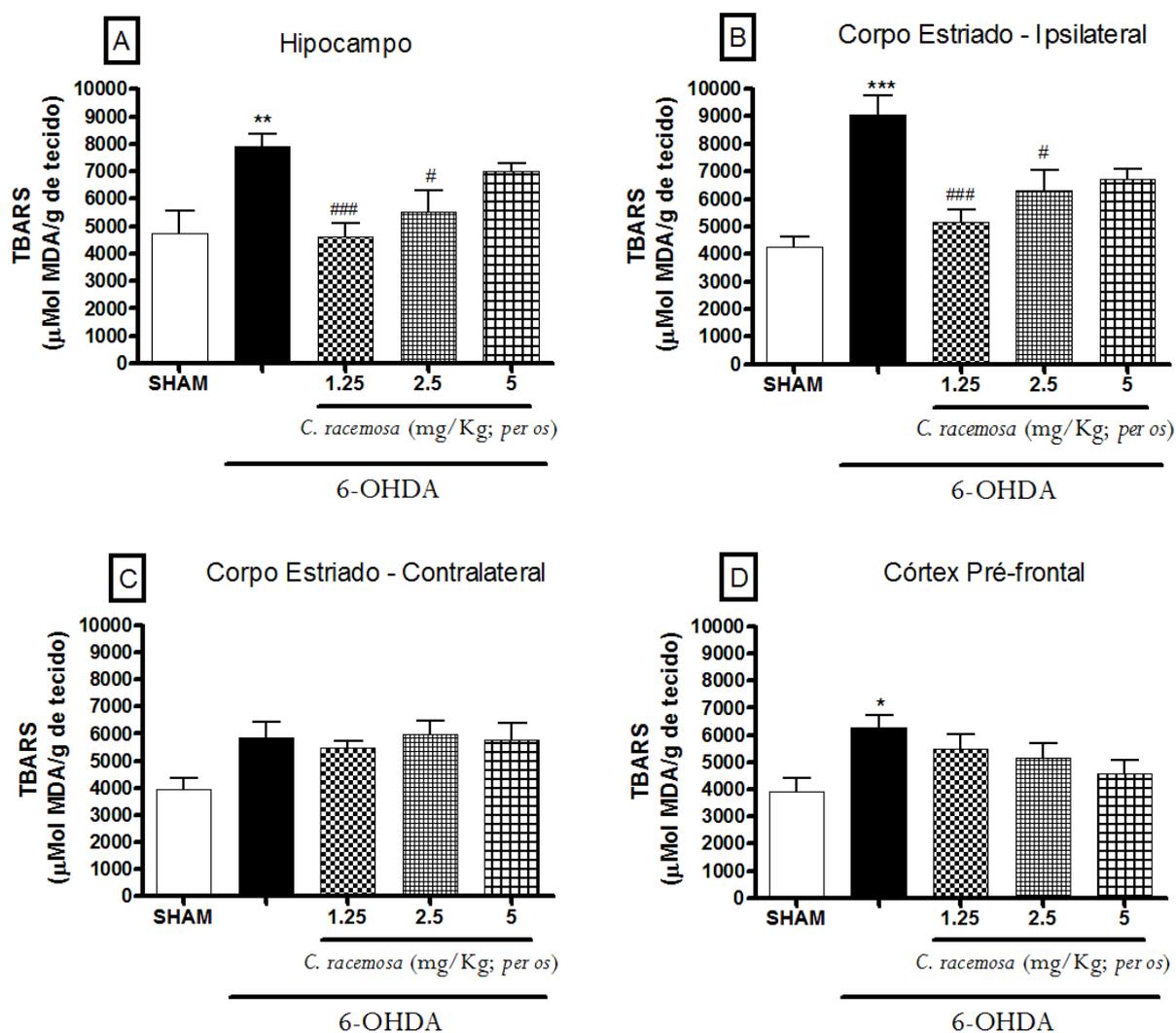
Adicionalmente, Cr (1,25 e 2,5 mg/Kg) não apresentou diferença significativa em nenhuma das doses analisadas em nenhuma área estuda em relação ao Sham (Figura 44).

Figura 43 - Análise da concentração de nitrito/nitrato nas áreas cerebrais.



Fonte: Arquivo pessoal da Autora. **Legenda:** (A) Hipocampo, (B) Corpo Estriado (Ipsilateral), (C) Corpo Estriado (Contralateral) e (D) Córtex Pré-Frontal. Os ratos (n=10 per grupo, machos, pesando aproximadamente 250-300 g) foram tratados com Cr (1,25; 2,5 e 5 mg/Kg per os) ou Salina (0,9%, per os) durante 21 dias após serem submetidos a cirurgia estereotáxica. No 22º dia, após 18h da aplicação da apomorfina, os animais foram sacrificados. Os dados estão expressos em médias \pm EPM. *One-way* ANOVA, Bonferroni. * e *** indicam diferenças $P < 0,05$ e $P < 0,001$, respectivamente, em relação ao Sham. #, ## e ### indicam diferenças $P < 0,05$, $P < 0,001$ e $P < 0,001$, em relação ao grupo 6-OHDA.

Figura 44 - Análise da concentração de Peroxidação Lipídica (TBARS) nas áreas cerebrais.



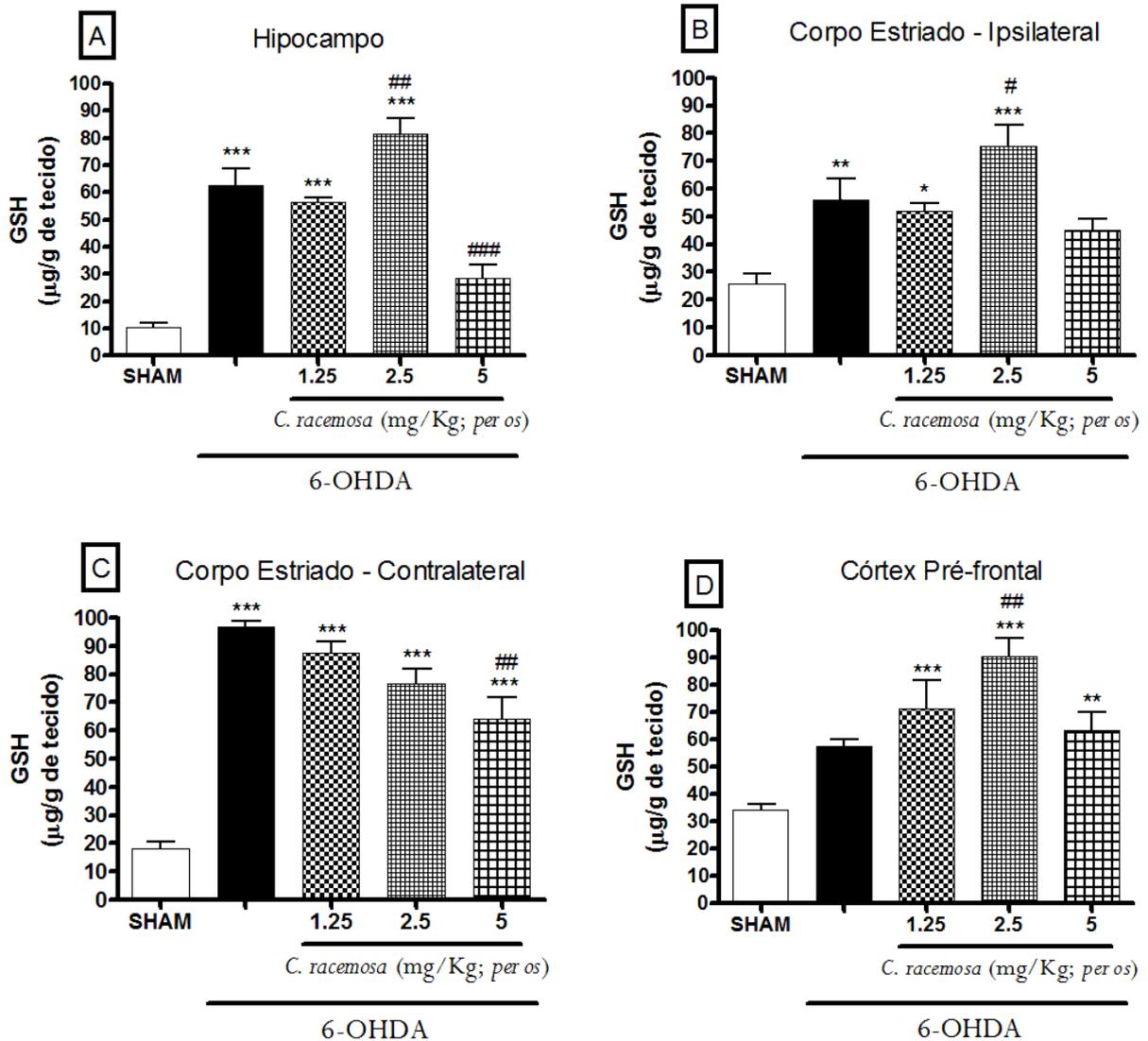
Fonte: Arquivo pessoal da Autora. **Legenda:** (A) Hipocampo, (B) Corpo Estriado (Ipsilateral), (C) Corpo Estriado (Contralateral) e (D) Córtex Pré-Frontal. Os ratos (n=10 per grupo, machos, pesando aproximadamente 250-300 g) foram tratados com Cr (1,25; 2,5 e 5 mg/Kg per os) ou Salina (0,9%, per os) durante 21 dias após serem submetidos a cirurgia estereotáxica. No 22º dia, após 18h da aplicação da apomorfina, os animais foram sacrificados. Os dados estão expressos em médias \pm EPM. *One-way* ANOVA, Bonferroni. *, ** e *** indicam diferenças $P < 0,05$, $P < 0,01$ e $P < 0,001$, respectivamente, em relação ao Sham. # e ### indicam diferenças $P < 0,05$ e $P < 0,001$, em relação ao grupo 6-OHDA.

13.4.3 Determinação da Concentração de Glutathiona Reduzida (GSH)

De acordo com os dados obtidos, houve um aumento significativo ($P < 0,001$) de GSH em todas as áreas analisadas do grupo 6-OHDA em relação ao grupo Sham. Animais tratados com Cr (2,5 mg/Kg) promoveu um aumento da atividade antioxidante, via GSH em hipocampo, corpo estriado (ipsilateral) e córtex pré-frontal de, aproximadamente, 38%, 39% e 55%, respectivamente, em relação ao grupo 6-OHDA. Por outro lado, todas as doses

aumentaram a atividade antioxidante em todas as áreas analisadas em relação ao grupo Sham (Figura 45).

Figura 45 - Análise dos níveis de Glutationa Reduzida (GSH) nas áreas cerebrais



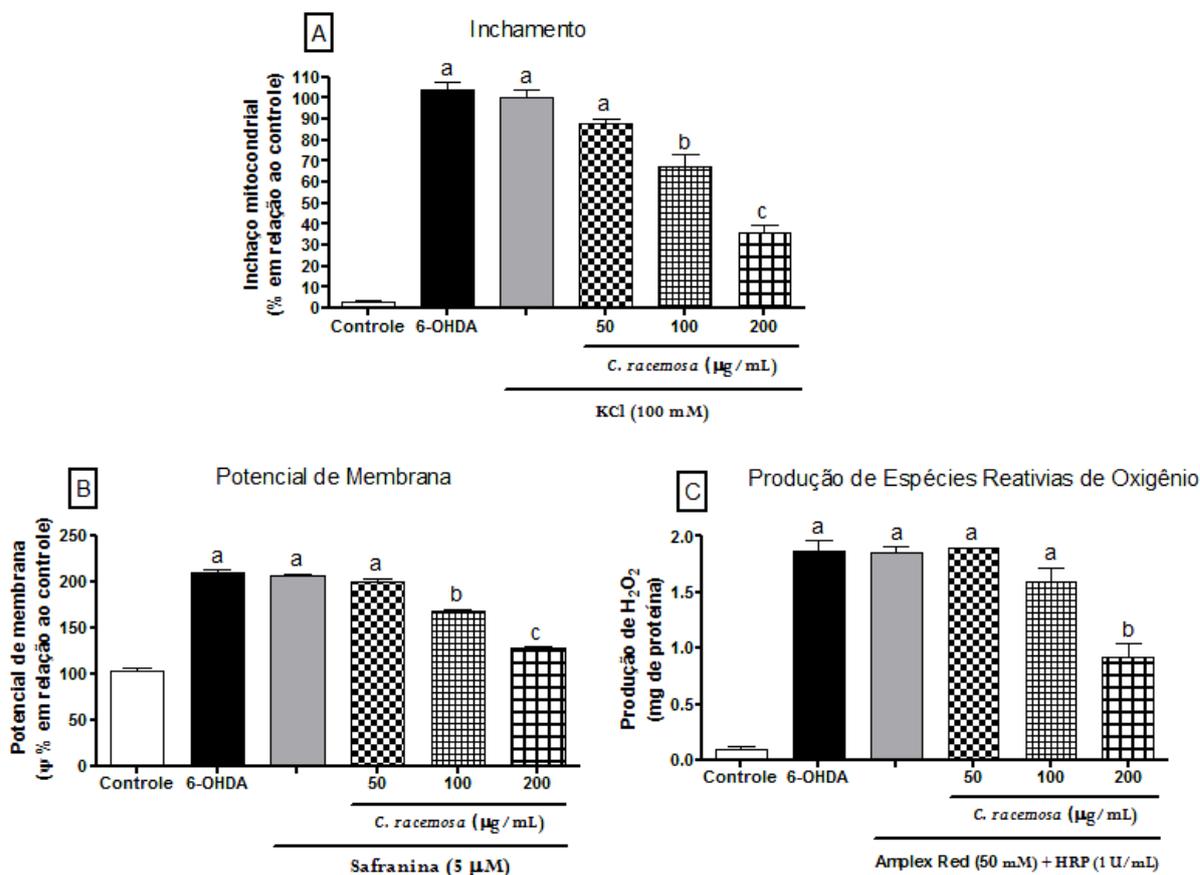
Fonte: Arquivo pessoal da Autora. **Legenda:** (A) Hipocampo, (B) Corpo Estriado (Ipsilateral), (C) Corpo Estriado (Contralateral) e (D) Córtex Pré-Frontal. Os ratos ($n=10$ per grupo, machos, pesando aproximadamente 250-300 g) foram tratados com Cr (1,25; 2,5 e 5 mg/Kg per os) ou Salina (0,9%, per os) durante 21 dias após serem submetidos a cirurgia estereotáxica. No 22º dia, após 18h da aplicação da apomorfina, os animais foram sacrificados. Os dados estão expressos em médias \pm EPM. *One-way* ANOVA, Bonferroni. *, ** e *** indicam diferenças $P<0,05$, $p<0,01$ e $P<0,001$, respectivamente, em relação ao Sham. # e ## indicam diferenças $P<0,05$ e $P<0,001$, em relação ao grupo 6-OHDA.

13.5 Análise de Atividade Antioxidante in vitro

13.5.1 Ensaio de Atividade Antioxidante em Mitocôndrias Submetidas a Estresses Oxidativos

Como o mecanismo de ação pró-neurodegenerativa de 6-OHDA está envolvido com alterações estruturais e eletro-químicas na mitocôndria, investigou-se os possíveis efeitos de Cr contra danos oxidativos induzidos em mitocôndrias isoladas de cérebros de ratos. Os resultados obtidos revelam alterações mitocondriais similares induzidas pela neurotoxina, em relação aos indutores oxidativos utilizados (KCL e Amplex Red), os quais provocaram aumentos significativos ($P < 0,001$) no inchamento (6-OHDA: $103,1 \pm 3,5$ %; KCl: $100,6 \pm 3,6$ %) (Figura 45 A), potencial de membrana (6-OHDA: $210,4 \pm 2,4$ %; KCl: $205,8 \pm 1,4$ %) (Figura 45 B) e produção de ROS (6-OHDA: $1,9 \pm 0,1$ ROS/mg de proteínas; KCl: $1,9 \pm 0,1$ ROS/mg de proteínas) (Figura 46 C) mitocondriais, em relação mitocôndrias não submetidas ao referido estresse oxidativo (controle: $3,1 \pm 0,6$ %; $102,3 \pm 2,3$ %; $0,1 \pm 0,0$ ROS/mg de proteínas, respectivamente). Por outro lado, mitocôndrias submetidas ao referido estresse oxidativo e pré-tratadas com Cr (100 ou 200 $\mu\text{g/mL}$) promoveram uma ação dose-dependente contra danos mitocondriais induzidos pelos indutores oxidativos (KCL e Amplex Red), diminuindo todos os parâmetros analisados (Cr 100: $67,0 \pm 5,9$ %; $167,4 \pm 3,0$ %; $1,6 \pm 0,1$ ROS/mg de proteínas; Cr 200: $35,6 \pm 4,3$ %; $128,2 \pm 1,4$ %; $0,9 \pm 0,1$ ROS/mg de proteínas, respectivamente) (Figura 46).

Figura 46 - Efeitos de Cr contra danos Mitocondriais induzidos por Indutores Oxidativos



Fonte: Arquivo pessoal da Autora. **Legenda:** Alterações estruturais e eletro-químicas induzidas pelos indutores oxidativos KCl ou Amplex Red + HRP, respectivamente, em mitocôndrias foram avaliados. Os parâmetros analisados foram (A) Inchaço, (B) Potencial de Membrana e (C) Produção de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS). Utilizou-se 6-OHDA e mitocôndrias não tratadas com Cr como controles positivos. Mitocôndrias não submetidas aos indutores oxidativos foram utilizadas como controle negativo. *One-way* ANOVA, Bonferroni. Letras iguais indicam ausência de diferenças estatísticas ($P > 0,05$).

13.6 Determinação da expressão do RNAm de mediadores Neuroinflamatórios e BDNF através de PCR quantitativa em tempo real (qPCR)

13.6.1 Análise do RNA Total Isolado de Hipocampo de Camundongos

Os RNA's isolados de todas as amostras apresentaram-se com qualidade, quando analisados por espectrofotometria ($A_{260/280}$ nm; AB >1.7) (Tabela 6) e por eletroforese (dados não mostrados).

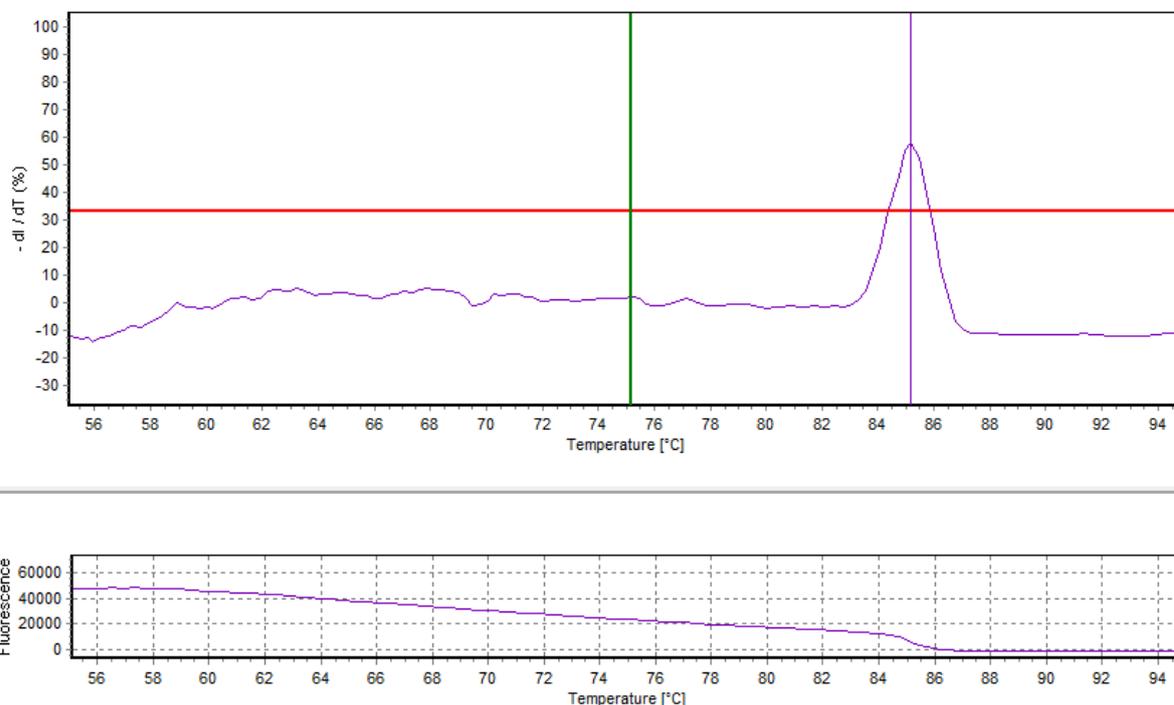
Tabela 6 - Quantificação do RNA total.

Grupo/amostra	Concentração ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	AB 260/280
Sham 1	278	1,675
Sham 2	398	1,842
Sham 3	290	1,859
Sham 4	330	1,702
Sham 5	236	1,815
Sham 6	382	1,891
Sham 7	436	1,832
6-OHDA 1	968	1,766
6-OHDA 2	424	1,769
6-OHDA 3	466	1,700
6-OHDA 4	272	1,789
6-OHDA 5	414	1,745
6-OHDA 6	420	1,794
6-OHDA 7	278	1,710
Cr 2,5 mg/Kg 1	356	1,780
Cr 2,5 mg/Kg 2	456	1,767
Cr 2,5 mg/Kg 3	358	1,798
Cr 2,5 mg/Kg 4	306	1,912
Cr 2,5 mg/Kg 5	346	1,700
Cr 2,5 mg/Kg 6	372	1,745
Cr 2,5 mg/Kg 7	282	1,809

Fonte: Laboratório de Genética Molecular – NUBIS/Sobral.

13.6.2 Avaliação da Especificidade dos Oligonucleotídeos (primers) utilizados através da Análise da Melting Curve

No presente estudo, as análises da *melting curve* indicaram a ausência de ampliações inespecíficas em todas os produtos amplificados (*amplicons*), após a reação de qPCR, demonstrando especificidade de todos os oligonucleotídeos (*primers*) utilizados no experimento (Figura 47).

Figura 47 - Análise da Curva de *Melting*.

Fonte: Arquivo pessoal da Autora. **Legenda:** Imagem ilustrativa dos resultados obtidos da curva de *melting* após a reação de amplificação por qPCR.

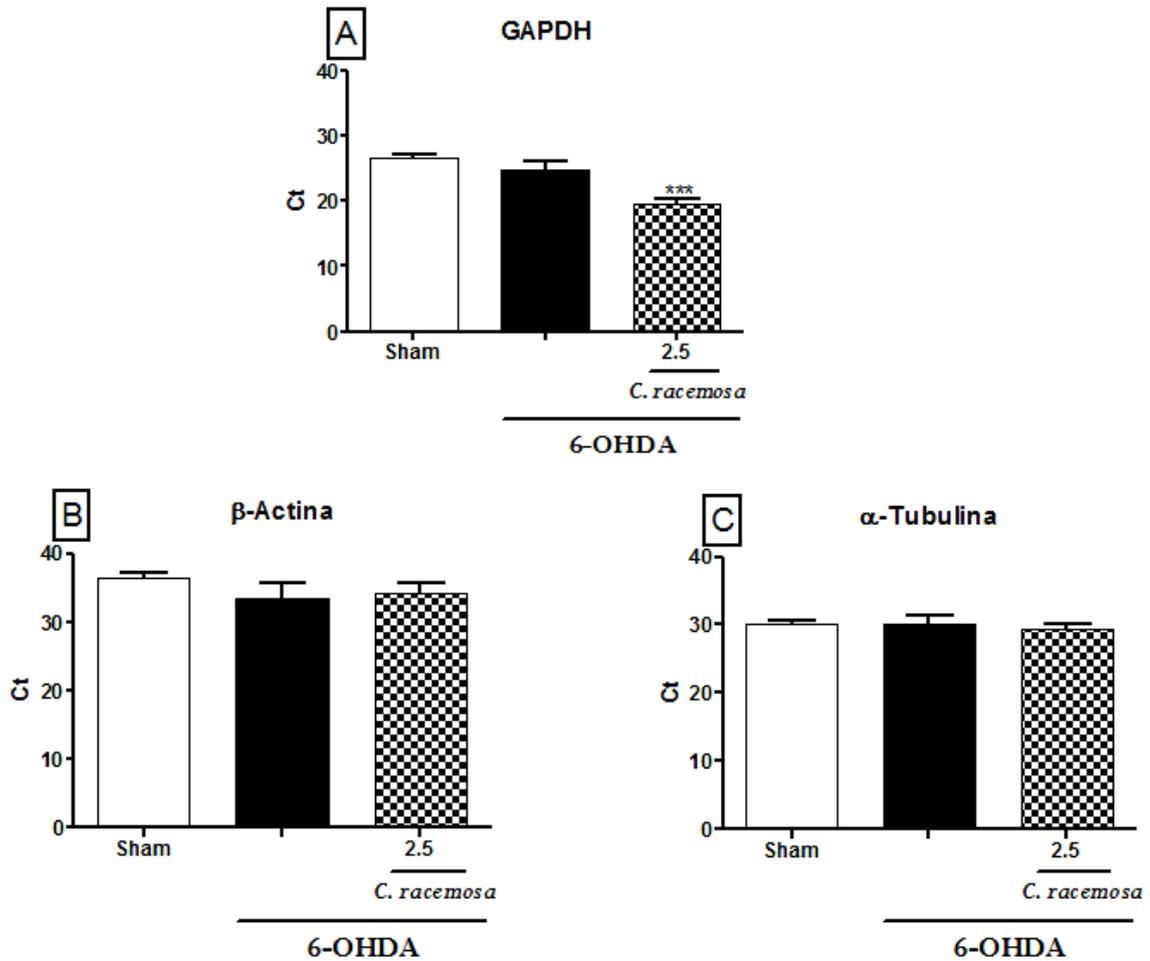
13.6.3 Análise dos Genes de Controle Endógeno (*Housekeepings*) nas Condições de Estudo Utilizadas

Antes da normalização dos dados de expressão gênica, obtidos por PCR em tempo real (qPCR), inicialmente, avaliaram-se possíveis alterações na expressão nos genes de controle endógeno (*housekeeping*) utilizados no presente estudo (GAPDH, β -Act e α -Tub).

Os dados obtidos, considerando a expressão basal de cada gene analisado em *cyclothreshold* (CT), mostram ausência de diferenças significativas na expressão dos genes β -Act e α -Tub analisados nos grupos 6-OHDA (21 μ g; via intraestriatal) ($33,4 \pm 2,2$; $30,0 \pm 1,2$, respectivamente) e Cr (2,5 mg/Kg/ *per os*) ($34,2 \pm 1,5$; $29,4 \pm 0,7$, respectivamente), em relação ao grupo Sham ($36,4 \pm 0,9$; $30,26 \pm 0,4$, respectivamente) (Figura 48). Desta forma, os referidos genes de controle endógeno analisados mostram-se eficientes como normalizadores fisiológicos, uma vez que não apresentaram alterações significantes decorrentes das modulações farmacológicas utilizadas (6-OHDA e Cr), em relação a animais do grupo Sham. Entretanto, o tratamento com Cr induziu a um aumento significativo da expressão de GAPDH (visualizado pela redução do valor de Ct) em corpo estriado de ratos

submetidos ao modelo de DP ($19,6 \pm 0,8$), em relação ao grupo Sham ($26,7 \pm 0,4$). Portanto, GAPDH não mostra-se como um gene de controle endógeno para normalização de dados de qPCR em estudos com Cr. Adicionalmente, 6-OHDA não demonstrou alterações significantes nos genes de controle endógeno analisados ($24,9 \pm 1,3$), em relação ao gr'upo Sham.

Figura 48 - Análise da expressão de RNA mensageiro dos genes de controle endógeno.



Fonte: Arquivo pessoal da Autora. **Legenda:** Os animais foram sujeitos ao modelo experimental de doença de Parkinson induzido por 6-OHDA e, posteriormente, tratados diariamente com Cr (2,5 mg/Kg/per os). Após eutanásia, corpo estriado (ipsilateral) foi removido e armazenado a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Os RNA's totais foram extraídos e purificados para a síntese de cDNA, seguido pela reação de qPCR. Posteriormente, a análise da expressão dos genes (A) GAPDH, (B) α -Tubulina e (C) β -Actina foi realizada utilizando valores de CT obtidos. *One-way* ANOVA, Bonferroni.

13.6.4. Análise dos Efeitos de CR na Expressão dos genes BDNF, IL1 β , p65 e iNOS em Corpo Estriado de Ratos submetidos a Modelo de DP por qPCR

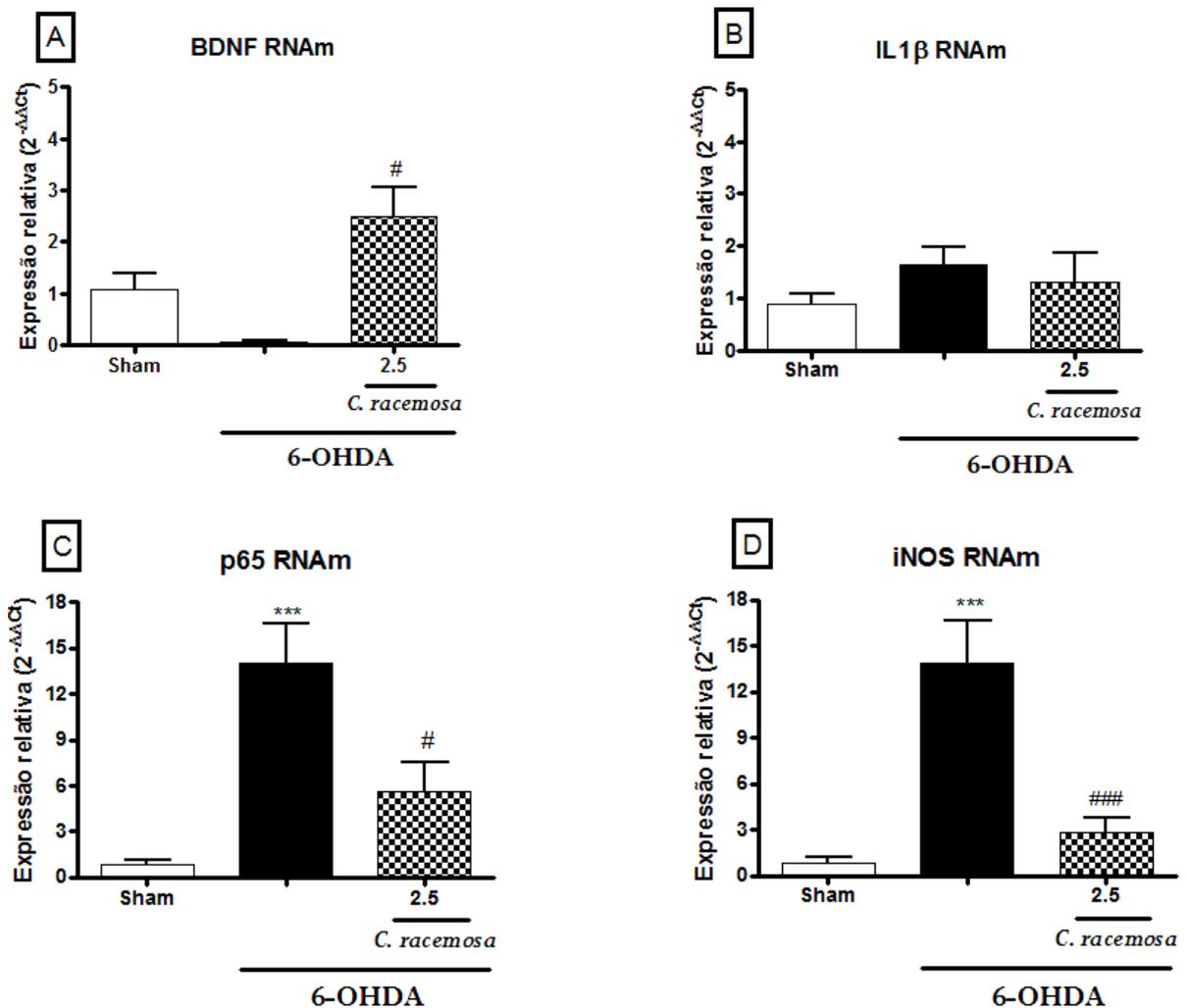
Para se avaliar os efeitos de Cr sob ratos submetidos ao modelo de DP a nível transcricional, realizou-se análise da expressão dos genes BDNF, IL1 β , p65 e iNOS, envolvidos na atividade neurodegenerativa induzida pela neurotoxina, 6-OHDA.

De acordo com os resultados, animais submetidos a neurotoxina e não tratados, apresentaram uma tendência a reduzir (quase 20 vezes) a expressão gênica de BDNF ($P > 0,05$; $0,06 \pm 0,02$ vezes), em comparação ao grupo Sham ($1,1 \pm 0,3$ vezes). Ainda neste grupo, houve um aumento significativo ($P < 0,001$) nos níveis de RNAm de p65 ($14,0 \pm 2,6$ vezes) e iNOS ($13,9 \pm 2,7$ vezes), em relação ao grupo Sham ($0,8 \pm 0,3$; $0,8 \pm 0,4$ vezes, respectivamente).

Animais submetidos ao modelo de DP e tratados com Cr (2,5 mg/Kg *per os*) apresentaram aumento ($P < 0,05$) dos níveis do RNAm de BDNF ($2,5 \pm 0,6$), e uma redução significativa na expressão gênica de p65 ($P < 0,05$; $5,6 \pm 1,9$ vezes), iNOS ($P < 0,001$; $2,8 \pm 1,0$ vezes), respectivamente, em relação ao grupo 6-OHDA.

Não foram encontradas alterações significativas nos níveis de RNAm de IL1 β entre os grupos (6-OHDA: $1,6 \pm 0,3$; Cr 2,5: $1,3 \pm 0,5$; Sham: $0,9 \pm 0,2$ vezes, respectivamente). Entretanto, o grupo 6-OHDA mostrou uma tendência a aumentar a expressão deste gene, em comparação ao grupo Sham (Figura 49).

Figura 49 - Análise por qPCR



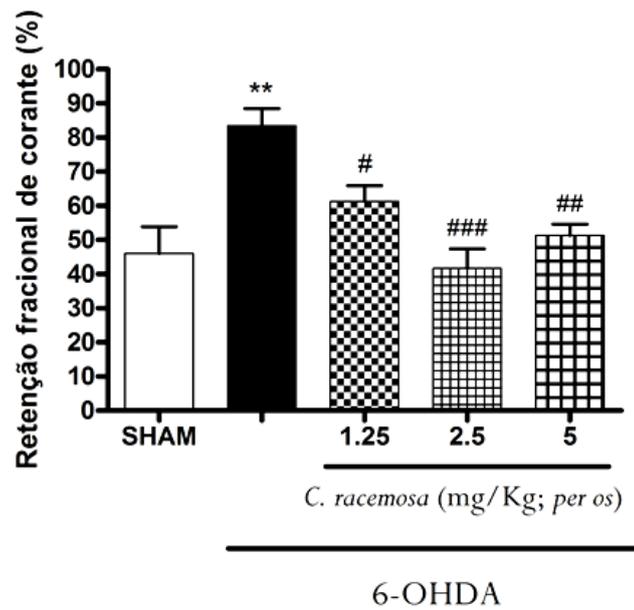
Fonte: Arquivo pessoal da Autora. **Legenda:** Os animais foram sujeitos ao modelo experimental de doença de Parkinson induzido por 6-OHDA e/ou ao tratamento com Cr (2,5 mg/Kg; *per os*). Após eutanásia, o corpo estriado (ipsilateral) foi removido e armazenado a -80 °C. Em seguida, foram extraídos os RNA's totais destas amostras e estes utilizados na síntese de cDNA, seguida pela reação de qPCR e análise da expressão dos genes (A) BDNF, (B) IL1β, (C) p65 e (D) iNOS pelo método 2^{-ΔΔCt}. Os genes foram normalizados através do uso de genes de controle endógeno: β-Actina e α-Tubulina. One-way ANOVA, Bonferroni. # e ### indicam diferenças P<0,05 e P<0,001, respectivamente, em relação ao grupo 6-OHDA. *** indica diferença P<0,001, em relação ao grupo Sham.

13.7 Esvaziamento Gástrico e Trânsito Gastrintestinal

Quando os animais foram submetidos a análise de esvaziamento gástrico, pôde-se observar que o grupo com a neurotoxina (6-OHDA) aumentou significativo (P<0,01) a retenção fracional do corante no estômago em 45%, em relação ao grupo Sham (Figura 50). Quando os animais foram submetidos ao tratamento com Cr (1,25; 2,5 e 5 mg/Kg), houve

uma redução desse corante em 23%, 51% e 40%, respectivamente, em relação ao grupo 6-OHDA. No entanto, nenhuma das doses apresentou diferença em relação ao grupo Sham.

Figura 50 - Esvaziamento Gástrico e Trânsito Gastrintestinal

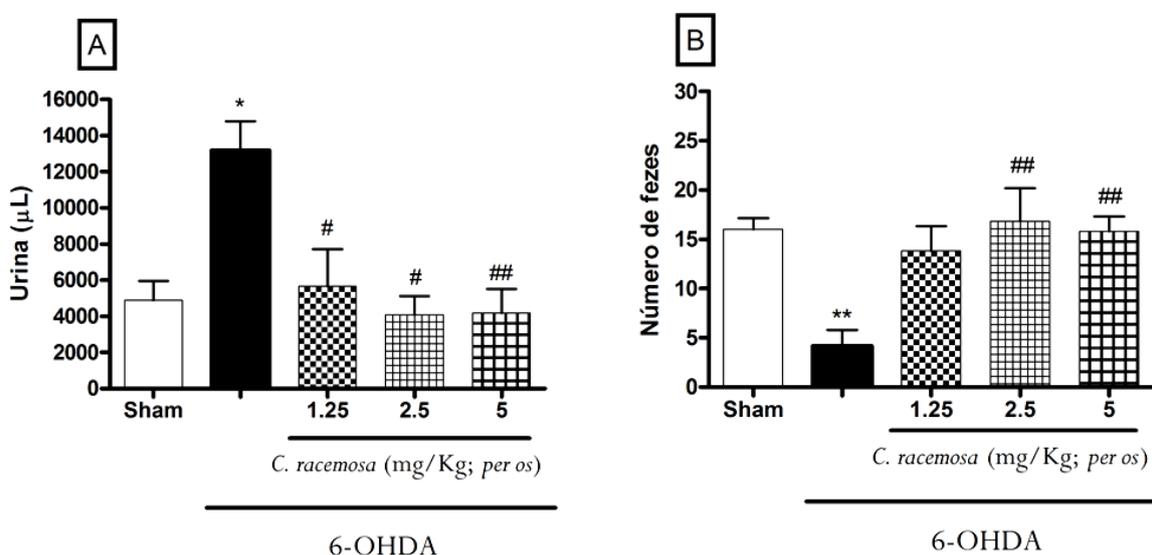


Fonte: Arquivo pessoal da Autora. **Legenda:** Retenção fracional de corante no estômago. Os ratos (n=10 *per* grupo, machos, pesando aproximadamente 250-300 g) foram tratados com Cr (1,25; 2,5 e 5 mg/Kg *per os*) ou Salina (0,9%, *per os*) durante 21 dias após serem submetidos a cirurgia estereotáxica. No 21º dia, após as análises comportamentais, os animais foram colocados em gaiolas metabólicas por um período de 12 horas, para verificar as alterações fisiológicas. Os dados estão expressos em médias \pm EPM. *One-way* ANOVA, Bonferroni. ** indica diferença $P < 0,01$, em relação ao Sham. # e ## indicam diferenças $P < 0,01$ e $P < 0,001$, em relação ao grupo 6-OHDA.

13.8 Análise da Atividade Renal e do Cólon

Quando analisado a atividade fisiológica (renal e cólon), notou-se que animais com a neurotoxina (6-OHDA) aumentou significativamente ($P<0,05$) a atividade renal e diminuiu significativamente ($P<0,01$) a atividade do cólon, em relação ao grupo Sham. Entretanto, quando os animais foram tratados com Cr (1,25; 2,5 e 5 mg/Kg), houve uma normalização da atividade renal e da atividade do cólon, em relação ao grupo 6-OHDA. Em nenhuma das atividades fisiológicas analisadas Cr apresentou diferença em relação ao Sham (Figura 51).

Figura 51 - Análise de Alterações da Atividade Renal e do Cólon



Fonte: Arquivo pessoal da Autora. **Legenda:** (A) Volume de urina (12h) e (B) Número de fezes (12h). Os ratos ($n=10$ per grupo, machos, pesando aproximadamente 250-300 g) foram tratados com Cr (1,25; 2,5 e 5 mg/Kg *per os*) ou salina (0,9%, *per os*) durante 21 dias após serem submetidos a cirurgia estereotáxica. No 21º dia, após as análises comportamentais, os animais foram colocados em gaiolas metabólicas por um período de 12 horas, para verificar as alterações fisiológicas. Os dados estão expressos em médias \pm EPM. *One-way* ANOVA, Bonferroni. ** e *** indicam diferenças $P<0,01$ e $P<0,001$, respectivamente, em relação ao Sham. #, ## e ### indicam diferenças $P<0,05$, $P<0,01$ e $P<0,001$, em relação ao grupo 6-OHDA.

14 DISCUSSÃO

O presente estudo descreve, pela primeira vez, os efeitos de *C. racemosa* associados a alterações locomotoras, neuroquímicas, moleculares e fisiológicas em animais submetidos a um modelo de doença de Parkinson, bem como a análise de possíveis mecanismos de ação envolvidos.

A associação entre mecanismos neuroinflamatórios e neurodegenerativos sugere que drogas ou bioativos com ação anti-inflamatória são alvos em potencial para a elaboração de novas estratégias farmacológicas em tratamentos contra DP (FRANK-CANNON et al., 2009; GUEDES; da SILVA, 2010; JARVELA et al., 2011; SEKIYAMA et al., 2012; MULLER; MUNICH, 2011; COLLINS et al., 2012). Por este motivo, o presente estudo buscou investigar os efeitos de *C. racemosa*, já descrita como sendo portador de atividade anti-inflamatória, antipirética e analgésica, dentre outras indicações (VERMES *et al.*, 2005), em modelo animal de DP induzido pela neurotoxina 6-hidroxidopamina (6-OHDA) em ratos.

Entre os principais problemas da DP, estão os distúrbios locomotores induzidos pelas alterações neuroquímicas decorrentes da morte de neurônios dopaminérgicos.

Neste trabalho, usando o modelo de doença de Parkinson, induzido por 6-OHDA, foram observados alguns dos principais achados descritos na literatura desta neurotoxina em ratos, como diminuição da atividade locomotora (Figuras 39), e alterações neuroquímicas características do modelo, como aumento dos níveis de nitrito/nitrato e de processos oxidativos (Figura 42 e 43) (BJORKLUND; KORDOWER., 2010; CHOTIBUT et al., 2012; ARAÚJO et al., 2013; JING et al., 2015). De acordo com a literatura, o referido modelo tem sido amplamente utilizado por sua excelência na reprodução de achados encontrados em pacientes com DP, principalmente em relação aos efeitos neuroquímicos (DUTY; JENNER, 2011; BOVÉ; PERIER, 2012).

O mecanismo de ação desta neurotoxina (6-OHDA) envolve um processo apoptótico seletivo de neurônios dopaminérgicos através de vias pró-oxidativas e próinflamatórias (DEXTER; JENNER, 2013), resultando nos achados clínicos da doença de Parkinson, como: desordens motoras, comportamentais e neuroquímicas (BOVÉ; PERIER, 2012). No referido modelo, os processos de neurodegeneração e de neuroinflamação ocorrem concomitantemente (MAIA et al., 2012).

Devido ao envolvimento de mecanismos próinflamatórios na via neuroapoptótica da 6-OHDA, estudos têm analisado agentes anti-inflamatórios em modelos utilizando esta neurotoxina, os quais têm demonstrado resultados positivos contra a ação de 6-OHDA em

roedores (COLLINS et al., 2012). Portanto a investigação do bioativo com a atividade anti-inflamatória poderia auxiliar no desenvolvimento de novas estratégias neurofarmacológicas contra processos neurodegenerativos e suas respectivas implicações neurocomportamentais e neuroquímicas.

Entre os bioativos descritos na literatura com atividade anti-inflamatória, podemos citar os fitoterápicos, obtidos de partes de plantas medicinais, os quais apresentam uma enorme variedade de estruturas. No Brasil, existem 520 medicamentos fitoterápicos registrados na Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), os fitoterápicos são considerados como uma extraordinária fonte natural para a prospecção de novos fármacos (ICTQ, 2011).

Os flavonoides são compostos bioativos derivados de plantas. Desde os tempos antigos vem sendo utilizado como suplementos alimentares para melhorar a função cognitiva e na prevenção de doenças neurodegenerativas (SPENCER, 2007). Extratos enriquecidos com flavonoides merecem uma maior atenção, devido ao seu potencial efeito neuroprotetor, visto que atualmente é crescente a busca por novas terapias para prevenção das doenças neurodegenerativas. *C. racemosa* apresenta em sua composição flavanóides, do tipo glicosídeos triterpenos, podendo ser aplicado na prevenção de doenças neurodegenerativas. Estes flavonoides podem ser capazes de atingir múltiplos locais no cérebro e assim prevenir doenças neurodegenerativas (SOLANKI, et al., 2015).

De acordo com Ali e colaboradores (2011), pacientes com DP apresentam, em comum, as desordens neurodegenerativas do movimento características da perda de neurônios dopaminérgicos, seguida pela diminuição dos níveis de dopamina. De acordo com os resultados, Cr promoveu uma proteção contra alterações locomotoras típicas de um animal afligido pela neurotoxina (6-OHDA), como mostrado na (Figura 39) e no teste de *Rota rod* (Figura 40), onde ambos os testes mostraram uma melhora significativa da atividade locomotora e equilíbrio. Estas alterações comportamentais, características em um animal com lesão cerebral semelhante ao parkinson, estão, relacionadas à diminuição de neurônios dopaminérgicos (BOVÉ; PERIER, 2012).

Assim como discutido no Capítulo I deste trabalho, Cr está diretamente relacionada com a modulação de dopamina e a ativação de receptores dopaminérgicos (D1 e D2), provavelmente devido a efeitos neuroprotetores que reduzem a morte neuronal e, portanto o déficit de dopamina. Este fato pode ser comprovado através do comportamento rotacional induzido por apomorfina, que representa o principal teste de verificação do estabelecimento da lesão no sistema dopaminérgico no modelo de DP induzido por uma injeção unilateral de

6-OHDA. Portanto quando usado o agonista dopaminérgico apomorfina em um animal com lesão unilateral por 6-OHDA ocorre rotação no sentido contralateral a lesão devido a morte dos neurônios do lado lesionado e a hipersensibilidade dos receptores dopaminérgicos do lado não lesionado (HEFTI *et al.*, 1980; GREALISH *et al.*, 2010) (Figura 42).

De acordo com a análise dos dados, Cr 2,5 mg/Kg reduziu o número de rotações contralaterais, provavelmente por um efeito neuroprotetor da Cr, contra os danos da neurotoxina (6-OHDA), houve redução da morte neuronal do lado lesionado levando a uma menor redução da concentração de dopamina e a redução da hipersensibilidade dos receptores dopaminérgicos do lado contralateral, conseqüentemente menor número de rotações contralaterais. Além disso, a provável recuperação do déficit motor demonstrado nos testes de *Rota rod* e campo aberto.

Corroborando com estes achados comportamentais observados nos testes de campo aberto, *Rota rod* e rotacional, Solanki e colaboradores (2015) verificaram que o uso de quercetina (50, 100 e 200 mg/Kg), também da classe dos flavonóides, em modelo de doença de Parkinson induzido por MPTP, promove uma melhora significativa em relação a atividade locomotora e equilíbrio, como também preveniu contra a depleção de dopamina e a perda de neurônios dopaminérgicos na substância negra.

O óxido nítrico (NO) é uma importante molécula de sinalização intracelular envolvida na regulação de diversos mecanismos fisiológicos e fisiopatológicos nos sistemas cardiovascular, nervoso e imunológico. Atua como um mediador biológico semelhante aos neurotransmissores do sistema neuronal (ALDERTON; COOPER; KNOWLES, 2001). Por outro lado, é um radical de oxigênio livre, e pode agir como um agente citotóxico em processos patológicos, em participar em doenças inflamatórias (BOGDAN, 2001).

Entre os mecanismos proapoptóticos de 6-OHDA, encontram-se o estresse nitrosativo e oxidativo, os quais envolvem o aumento dos níveis de nitrito/nitrato (NO₂/NO₃) e peroxidação lipídica em áreas cerebrais de roedores (ATTA; SINHA; CHATTOPADHYAY, 2000; GILGUN-SHERKI; MELAMED; OFFEN, 2001; DAUAER; PRZEDBORSKI, 2003; ARAÚJO *et al.*, 2013). No presente estudo, Cr (1,25; 2,5 e 5 mg/Kg) apresentou uma ação antioxidante contra 6-OHDA *in vivo*, reduzindo os níveis aumentados de NO₂/NO₃, e peroxidação lipídica a condições próximas as normais (Figuras 43 e 44). Estes achados corroboram com os de Schmid e colaboradores (2009), que embora tenham utilizado estudos *in vitro*, demonstram que o extrato aquoso de Cr inibiu a produção de NO em 82% em macrófagos. Portanto, segundo estes dados, pode-se sugerir uma atividade antioxidante de Cr

em áreas cerebrais de ratos, os quais estariam envolvidos com a atividade neuroprotetora da Cr.

Do ponto de vista biológico, podemos definir antioxidantes como aqueles compostos que protegem os sistemas biológicos contra os efeitos deletérios dos processos ou das reações que levam à oxidação de macromoléculas ou estruturas celulares. A glutathiona (GSH, L- γ -glutamil-L-cistetilglicina) é um tripeptídeo, contendo cisteína e é o tiol não protéico mais abundante nas células dos mamíferos. Concentrações baixas de GSH têm sido reportadas em algumas doenças, como a AIDS, e estão associadas a um maior risco de estresse oxidativo e da ocorrência de infecções oportunistas. Este decréscimo do GSH pode refletir o aumento na produção de antioxidantes, num grau que excederia a capacidade de detoxificação do GSH (BRAY; TAYLOR, 1993; MEISTER, 1995). Para a verificação de uma possível ação antioxidante de extratos de *C. ramecosa*, observou-se que Cr aumentou os níveis de GSH, e, possivelmente, atuando via indução de glutathiona reduzida (Figura 45).

Até o momento, os resultados descritos, sugerem uma atividade neuroprotetora de Cr, dentre os quais está a redução dos níveis de NO₂/NO₃ e peroxidação lipídica, que poderia estar atuando através da modulação de agentes antioxidantes, possivelmente via GSH *in vivo*, principalmente na área onde a neurotoxina foi injetada (corpo estriado ipsilateral).

O principal e, possivelmente, o primeiro alvo da neurotoxina, 6-OHDA, é a mitocôndria (XIE; BEZARD; ZHAO, 2005). Quando 6-OHDA penetra no neurônio dopaminérgico pelo transportador de dopamina, por mimetismo molecular, ocasiona distúrbios eletroquímicos nas membranas mitocondriais, como o aumento do potencial de membrana (Figura 46 B) e da produção de ROS (Figura 46 C), podendo ocorrer concomitantemente, em algumas vezes, alterações na estrutura da organela, como inchaço mitocondrial (Figura 46 A) pela abertura de poros (XIE; BEZARD; ZHAO, 2005; GALINDO et al., 2012; WANG et al., 2013). Este processo citotóxico resulta na diminuição da produção de energia (ATP) para a célula, fissão mitocondrial e/ou mitofagia, bem como em ativação de cascatas intracelulares envolvidas na apoptose celular (GOMEZ-LÁZARO et al., 2008; TÓBON-VELASCO et al., 2013). Por este motivo, investigou-se os efeitos de Cr em mitocôndrias isoladas de cérebros de ratos, estas submetidas a um ambiente e condições de estresse oxidativo.

Os dados mostram uma diminuição das alterações estruturais e eletroquímicas analisadas (inchamento, potencial de membrana e produção de ROS, respectivamente) (Figuras 46), sugerindo um efeito protetor de Cr contra danos mitocondriais induzidos por 6-OHDA. Desta maneira, o presente estudo sugere que Cr estaria apresentando uma atividade

neuroprotetora através da proteção mitocondrial, impedindo as alterações estruturais e eletroquímicas na organela, induzidas por ROS, auxiliando assim na manutenção celular e, conseqüentemente, na sua sobrevivência.

O corpo estriado é uma das principais estruturas cerebrais relacionadas com a atividade motora e locomotora em animais (TEPPER et al., 2010). Ele coordena e modula vias do movimento e também está envolvido com uma variedade de processos cognitivos, como funções executiva de tarefas e também na memória (VOYTEK et al., 2010). Esta área cerebral é rica em neurônios dopaminérgicos, que possuem receptores sensíveis a dopamina que, após sua ativação, desencadeiam uma cascata sinalizatória secundária de respostas que modulam funções pré e pós-sinápticas, tanto a curto, quanto a longo prazo (GREENGARD, 2001; CACHOPE; CHEER, 2014).

Na doença de Parkinson, a ocorrência da perda de neurônios dopaminérgicos nessa área resulta em uma cascata de eventos celulares e neuroquímicos que culminam nos principais achados dessa patologia, como as alterações fisiológicas e locomotoras. Dentre estes eventos neuroquímicos, podem-se destacar as alterações transcricionais, as quais podem iniciar ou inibir determinados genes-chave de regulação de vias, como os fatores de transcrição, ou de síntese de proteínas sinalizatórias envolvidas em respostas próinflamatórias e atividades neuroprotetoras. Por este motivo, no presente estudo, foram analisados os efeitos do tratamento crônico com Cr na expressão de genes de controle endógeno (GAPDH, β -Act e α -Tub), genes envolvidos no processo neuroinflamatório (IL1 β , p65 e iNOS) e na proteção neuronal (BDNF), em corpo estriado de ratos submetidos ao modelo de DP induzido pela neurotoxina, 6-OHDA.

Inicialmente, pôde-se verificar que dentre os genes de controle endógeno avaliados, os níveis de RNAm de GAPDH apresentaram-se mais altos em corpo estriado de animais tratados com Cr (2,5 mg/Kg, *per os*) (Figura 49).

O GAPDH (gliceraldeído 3-fosfodesidrogenase), também conhecido por G3PDH, é uma enzima envolvida na catálise da glicose para geração de energia durante a via glicolítica, e também tem sido reportado na literatura por apresentar-se como um regulador transcricional (TARZE et al., 2007). Ele é um dos genes mais estáveis e expresso constitutivamente em altos níveis em vários tecidos e células, e, portanto, relatado como com a função de gene *housekeeping*. Por esta razão, o GAPDH é comumente empregado em estudos em biologia molecular como controle para análises proteicas, por *Western blot*, e transcriptômicas, por qPCR. Entretanto, corroborando com os achados deste estudo, a literatura tem reportado alterações da expressão de GAPDH em algumas condições específicas como por exemplo, em

experimentos associados com a ativação de fatores específicos de transcrição, que possuem a capacidade de regular positivamente a expressão deste gene, como o fator MZF-1 (*myeloid zinc finger-1*), e em modelos de isquemia em tecido muscular esquelético (BARBER et al., 2005; BAILEY et al., 2011; PISZCZATOWSKI et al., 2014).

Os resultados deste trabalho sugerem uma possível ação regulatória do fitoterápico sobre controle de expressão deste gene e, assim, o coloca fora da lista de possíveis *housekeepings* a serem utilizados em estudos com o referido fitoterápico nestas condições analisadas. Por outro lado, não foram detectadas alterações na expressão dos outros *housekeepings* utilizados (β -Act e α -Tub) nas condições avaliadas, utilizando Cr. Desta forma, estes genes podem ser sugeridos como genes de controle endógeno para a realização de estudos transcriptômicos com Cr.

Apesar desta modulação positiva do gene GAPDH, Gaube e colaboradores (2007) reporta o uso deste gene como *housekeeping* e o usa para a normalização de seus dados de qPCR. Em seu estudo, o autor avalia os efeitos de Cr sobre a expressão de genes em linhagens de células MCF-7 de câncer humano. Entretanto, não foram avaliadas os efeitos de Cr na expressão do gene GAPDH nas condições experimentais utilizadas ou de qualquer outro possível gene de controle endógeno, as quais podem ter implicações negativas para os resultados apresentados no referido estudo.

Para a avaliação de uma possível implicação neuroprotetora de Cr na doença de Parkinson, via fatores neurotróficos, realizou-se análise dos efeitos deste fitoterápico na expressão do gene BDNF em corpo estriado de ratos submetidos ao modelo de DP por 6-OHDA. De acordo com os resultados obtidos, a neurotoxina apresentou uma tendência a reduzir os níveis de expressão deste gene neuroprotetor (Figura 49). Estes dados corroboram com os achados da literatura, que reportam que 6-OHDA diminui os níveis transcricionais e proteicos de BDNF em ensaios tanto *in vitro* e *in vivo* (CHALOVICH et al., 2006; LI et al., 2013).

Por outro lado, a análise por qPCR revelou que animais submetidos a 6-OHDA e tratados Cr (2,5 mg/Kg *per os*) apresentaram uma modulação positiva nos níveis de RNAm de BDNF, retornando a níveis basais (Figura 49).

De acordo com outros estudos, terapias envolvendo fatores neurotróficos, como o BDNF, podem apresentar benefícios no avanço dos estágios da progressão da doença de Parkinson (SCALZO et al., 2010; ATHAUDA; FOLTYNIE, 2015). Em 1995, Shults e colaboradores, já relatavam os efeitos benéficos de BDNF em processo neurodegenerativo induzido por 6-OHDA em ratos, os quais também são corroborados com outros estudos *in*

vivo (SINGH et al., 2006; TUON et al., 2014). Desta forma, pode-se sugerir que Cr estaria utilizando um mecanismo neuroprotetor contra processos neurodegenerativos, via indução BDNF.

Outra linha envolvida no processo neurodegenerativo são os processos neuroinflamatórios, o qual consiste na ativação de vias próinflamatórias. Estudos relatam a neuroinflamação como um componente-chave na indução e progressão de processos neurodegenerativos no SNC (FRANK-CANNON et al., 2009; GUEDES; SILVA, 2010). Por este motivo, investigaram-se os efeitos de Cr (2,5 mg/Kg *per os*) na expressão dos genes próinflamatórios IL1 β e p65, pois como visto nos resultados comportamentais e neuroquímicos, Cr 2,5 mg/Kg, foi a dose que melhor teve efeito contra os danos causados por 6-OHDA.

De acordo com os achados deste estudo, 6-OHDA apresenta uma tendência a aumentar os níveis de RNAm de IL1 β , mas similarmente aos dados obtidos do grupo tratado com Cr (2,5 mg/Kg *per os*), não apresentaram diferenças significativas (Figura 48).

Corroborando com esses dados, Koprach e colaboradores (2008) relatam que, em modelo de DP induzido por injeção unilateral 6-OHDA (22,5 μ g), os níveis proteicos de IL1 β também não apresentaram diferenças significativas em ratos submetidos a lesão em corpo estriado, após 12 dias. Por outro lado, o envolvimento de IL1 β é relatado pelo autor ao demonstrar que a perda de neurônios dopaminérgicos é prevenida pelo tratamento com o uso de um antagonista deste mediador.

Leal e colaboradores (2013) ao apresentar uma revisão sobre os aspectos do envolvimento de IL1 β na doença de Parkinson, concluem que o uso de drogas inibidoras desse referido mediador podem contribuir para uma terapia no tratamento de DP.

Assim, de acordo com a literatura e através das análises dos resultados de qPCR deste estudo, pode-se sugerir que a transcrição de IL1 β , apesar de não apresentar um aumento em corpo estriado de ratos submetidos a 6-OHDA, apresenta um envolvimento no processo neurodegenerativo. Entretanto, outros modelos mais específicos para a indução de processos neuroinflamatórios devem ser realizados para se investigar melhor o papel deste mediador próinflamatório na patogênese da DP.

A transcrição de genes é controlada por uma ou várias proteínas capazes de se ligarem ao a sequencias específicas no DNA para promoverem ou inibirem a síntese de RNA de um ou mais genes. Estas proteínas são denominadas de fatores de transcrição (KARIN, 1990; LATCHMAN, 1997)

Um dos principais fatores de transcrição envolvidos na resposta inflamatória, pode-se citar o NFkB (fator nuclear *kappa* B). Este fator transcricional pode ser encontrado em quase todos os tipos de células animais e está envolvido na resposta a estímulos de estresse, citocinas, processos oxidativos, radiação ultra-violeta, pela presença de patógenos virais e bacterianos (GILMORE, 1999), na atividade neuroplástica hipocampal (ALBENSI; MATTSON, 2000) e em doenças neurodegenerativas, como doença de Alzheimer e Parkinson (WANG et al., 2011; DUAN et al., 2014).

Entre as proteínas constituintes da família NFkB, a p65, também conhecida como REL-A ou NFkB3, está associada a formação, ativação e translocação nuclear deste fator de NFkB (NOLAN et al., 1991; LI; VERMA, 2002). De acordo com a literatura, p65 está envolvido na etiopatologia da doença de Parkinson, auxiliando no aumento da atividade do fator de transcrição NFkB (PRANSKI et al., 2013) e, conseqüentemente, em um *feedback* positivo na produção de mediadores próinflamatórios.

Com base nesse contexto, realizou-se a análise dos efeitos de Cr na expressão do gene p65 por qPCR em corpo estriado de ratos submetidos ao modelo de DP. Os dados mostram que o tratamento por 21 dias com Cr (2,5 mg/Kg *per os*) foi capaz de reduzir significativamente os níveis de RNAm de p65 na área cerebral analisada, em contraste com animais não tratados (Figura 48).

Segundo Cao e colaboradores (2013), a via de sinalização de p65 pode agir negativamente na atividade neuroprotetora, como no caso de fatores neurotróficos, o que pode contribuir para os efeitos apoptóticos induzidos pela neurotoxina em neurônios dopaminérgicos. Estes dados podem auxiliar para explicar a modulação negativa observada na expressão do gene BDNF em corpo estriado de animais submetidos a 6-OHDA.

Cr é descrito por possuir ação anti-inflamatória, entretanto, Schmid e colaboradores (2009) relatam que ela não foi capaz de inibir a expressão proteica de p65 induzida por lipolissacarídeos, em cultura de monócitos/macrófagos RAW 264.7 (isolados de camundongos). Por outro lado, Qiu e colaboradores (2007) relata que, em cultura de células da medula óssea (isoladas de camundongos), um triterpeno glicosídeo isolado do extrato de *C. racemosa*, denominado 25-acetil cimigenol xilopiranosídeo, foi capaz de inibir a expressão proteica de p65. Portanto, possivelmente a modulação de p65 por Cr pode estar relacionado ao tipo de célula analisado ou pela concentração de componentes específicos presentes no extrato de Cr, como o 25-acetil cimigenol xilopiranosídeo.

De acordo com o fabricante do Aplause®, fármaco utilizado para o tratamento com Cr, os componentes majoritários são os glicosídeos triterpenos. Assim, possivelmente o

efeito de Cr sobre a expressão do gene p65 pode estar intimamente relacionado ao tecido-alvo analisado. E, no presente estudo, a partir da análise dos resultados, pode-se sugerir que células neuronais em corpo estriado podem ser um desses tecidos-alvo para ação dos glicosídeos triterpenos de *C. racemosa*, no qual Cr atua na modulação do fator de transcrição NFkB.

Entre as enzimas reguladas pelo fator de transcrição NFkB, pode-se citar a iNOS (óxido nítrico sintase). Este gene pertence a família de genes responsáveis pela produção de enzimas catalisadoras presentes na via de produção do óxido nítrico (KNOWLES; MONCADA, 1994). São conhecidas três isoformas em mamíferos e uma em bactéria. Dentre os mamíferos, são denominadas em nNOS (ou NOS1), eNOS (também conhecida por NOS3 ou cNOS) e iNOS (ou NOS2), sendo as duas primeiras produzidas constitutivamente nos tecidos neuronais e endotelial, e a última sua forma induzida (STUHER, 1999).

Segundo Aktan (2004), a família NOS controla a produção de óxido nítrico (NO), a qual possui importantes papéis em diversos processos biológicos e patológicos. Alterações nos níveis fisiológicos de NO podem implicar em efeitos positivos ou negativos para funções biológicas dependendo do tecido ou situação a qual se encontra. Em condições fisiológicas, o NO pode inibir agregação plaquetária, processos de adesão mediado por integrinas, expressão de genes próinflamatórios, injúrias oxidativas e outros efeitos deletérios. Entretanto, durante processos inflamatórios, os níveis de iNOS se encontram aumentados, o que resulta em uma maior produção de NO. Essa super produção, associado com reações com moléculas de oxigênio livres, ocasiona o aparecimento de intermediários de NO reativos, como o nitrito, que por sua vez podem interferir em diversos processos biológicos e ocasionar alterações deletérias, como danos teciduais, inibição da respiração mitocondrial, inibir a atividade antioxidante de enzimas, como a glutathione peroxidase, e de outros agentes antioxidantes, como celulares, como o ácido ascórbico, ácido úrico e tióis.

Entre as patologias em que os níveis de NO e iNOS se encontram alterados, pode-se citar a DP (DURRENBERGER et al., 2012). Desta forma, procurou-se investigar os efeitos de Cr na expressão de iNOS em corpo estriado de ratos submetidos ao modelo de DP.

A literatura relata que o uso da neurotoxina, 6-OHDA, em modelo de DP tanto *in vitro*, quanto *in vivo*, é capaz de induzir o aumento da expressão gênica e proteica de iNOS, sugerindo que este mediador inflamatório possui um papel importante no mecanismo neurodegenerativo induzido pela neurotoxina em neurônios dopaminérgicos (LI et al., 2012). Estes resultados estão de acordo com os obtidos no presente estudo, os quais demonstram que 6-OHDA é capaz de regular positivamente a expressão do gene iNOS em corpo estriado e aumentar os níveis de nitrito/nitrato em áreas cerebrais de ratos (Figuras 43 e 49).

Em contrapartida, de acordo com as análises por qPCR, o tratamento com Cr (2,5 mg/Kg *per os*) promoveu um retorno dos níveis do RNAm de iNOS a condições basais, em relação a ratos com DP não tratados. Estes dados corroboram com os resultados obtidos nas dosagens de nitrito/nitrato nas áreas cerebrais dos animais submetidos ao modelo de DP e tratados com Cr onde foi verificada a redução das concentrações de nitrito/nitrato (Figuras 43 e 49).

Ainda nesse contexto, estes achados corroboram com estudo de Schmid e colaboradores (2009), que relata que extrato de *C. racemosa* apresenta atividade inibitória da expressão gênica e proteica de iNOS, e conseqüentemente, na produção de nitrito, induzido por lipolissacarídeos.

Em resumo, os dados de qPCR mostraram que o tratamento durante 21 dias com Cr (2,5 mg/Kg *per os*) possui atividade neuroprotetora contra 6-OHDA, possuindo um mecanismo neuroprotetor envolvendo o aumento dos níveis de RNAm de BDNF e apresentando uma atividade anti-neuroinflamatória, reduzindo a expressão dos genes de p65 e iNOS a níveis basais, em corpo estriado de ratos submetidos a modelo de DP induzido por 6-OHDA.

A capacidade de esvaziar o conteúdo do estômago, chamada gastroparesia, é outra possível complicação gastrointestinal do DP. A dificuldade do estômago para esvaziar na hora certa também pode reduzir ou retardar a eficácia dos medicamentos para DP, especialmente da levodopa, uma vez que é absorvido no intestino delgado e não pode chegar ao seu destino por ficar presa no estômago (PARKINSON'S DISEASE FOUNDATION, 2007). O tratamento para a gastroparesia em Parkinson não tem sido extensivamente estudado (JULIO-PIEPER et al., 2014).

Os tratamentos para a constipação em DP envolvem a tomada de medidas destinadas a aumentar a motilidade do cólon. Existe uma busca para encontrar novos tratamentos que aumentem a velocidade de trânsito através do cólon, no entanto, até o momento, não há estudos que investiguem possíveis agentes (PARKINSON'S DISEASE FOUNDATION, 2015). Ao verificar a ação da Cr no esvaziamento gástrico em ratos submetidos a doença de Parkinson e tratados com Cr (1,25, 2,5 e 5 mg/Kg/ 21 dias/ *per os*), pôde-se observar que todas as doses de Cr diminuíram a retenção fracional do corante no estômago em relação aos animais controle lesionados.

Em relação a atividade renal, Cr diminuiu essa atividade, conseguindo levar a mesma para níveis basais. Quanto a atividade do cólon, Cr promoveu o retorno a quantidades similares a animais Sham. Portanto, Cr além de reverter os danos locomotores, bioquímicos e

moleculares causados pela neurotoxina, demonstra a capacidade de proteger o trato digestório e a função renal contra as alterações induzidas por 6-OHDA, características de pacientes com DP.

Desta forma, os resultados apresentados sugerem que o modelo de DP induzido por 6-OHDA também pode ser utilizado para se evidenciar alterações na motilidade gástrica e na atividade renal, característicos de pacientes com DP. Adicionalmente, a Cr demonstrou ser um potencial agente terapêutico para auxiliar no tratamento de alterações no processo de motilidade gastro-intestinal e evacuação, bem como em um retorno do processo de micção a condições normais em ratos submetidos a modelo de DP induzido por 6-OHDA.

15 CONCLUSÃO

De acordo com o exposto, o presente estudo, demonstra efeitos associados a uma possível atividade neuroprotetora apresentada pelo fitoterápico *Cimicifuga racemosa*, promovendo uma proteção contra alterações fisiológicas e locomotoras induzidas pela neurotoxina 6-OHDA em ratos. Adicionalmente, este estudo sugere um possível mecanismo neuroprotetor agindo através de ação antioxidante de GSH e de proteção mitocondrial, bem como uma regulação a nível transcricional na via de produção de óxido nítrico e de fator neurotrófico derivado do cérebro. Desta forma, sugerisse que Cr poderia ser utilizada como um agente terapêutico em potencial para pesquisas clínicas sobre distúrbios neurológicos, decorrentes de processos neurodegenerativos.

16 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo relata os efeitos comportamentais, neuroquímicos e transcriptômicos do extrato etanólico de *Cimicifuga racemosa* em camundongos e, pela primeira vez, uma possível atividade neuroprotetora em ratos, cujo mecanismo de ação provavelmente envolve regulação gênica e proteção mitocondrial, via ação antioxidante, com capacidade de reduzir as alterações comportamentais e neuroquímicas induzidas por 6-OHDA em ratos submetidos a lesão intraestriatal unilateral. A partir desses resultados obtidos podem surgir novas perspectivas para o uso deste fitoterápico como parte de estratégias farmacológicas para transtornos de ansiedade e depressão, bem como para o tratamento de doenças neurodegenerativas, como a doença de Parkinson. Adicionalmente, o tratamento crônico com o referido fitoterápico não demonstrou alterações fisiológicas sugestivas de toxicidade em modelos animais, sugerindo assim, uma segurança farmacológica para seu uso por humanos.

REFERÊNCIAS

- AENLLE, K. K.; FOSTER, T. C. Aging alters the expression of genes for neuroprotection and synaptic function following acute estradiol treatment. **Hippocampus**, v. 20, n. 9, p. 1047-1060, 2010.
- AJETUNMOBI, A.; PRINA-MELLO, A.; VOLKOV, Y.; CORVIN, A.; TROPEA, D. Nanotechnologies for the study of the central nervous system. **Prog Neurobiol**, v. 123, p. 18-36, 2014.
- AKERMAN, K. E.; WIKSTROM, M. K. Safranin as a probe of the mitochondrial membrane potential. **FEBS Lett**, v. 68, p. 191-197, 1976.
- AKRAM, M.; HAMID, A.; KHALIL, A.; GHAFAR, A.; TAYYABA, N.; SAEED, A.; ALI, M.; NAVEED, A. Review on medicinal uses, pharmacological, phytochemistry and immunomodulatory activity of plants. **Int J Immunopathol Pharmacol**, v. 27, p. 9-313, 2014.
- AKTAN, F. iNOS-mediated nitric oxide production and its regulation, v. 75, p. 53-639, 2004.
- AL-ASMARI, A.K.; AL-ELAIWI, A.M.; ATHAR, M.T.; TARIQ, M.; AL EID, A.; AL-ASMARY, S.M. A review of hepatoprotective plants used in Saudi traditional medicine. **Evid Based Complement Alternat Med**, 2014.
- AL OMRAN, Y.; AZIZ, Q. Functional brain imaging in gastroenterology: to new beginnings. **Nat Rev Gastroenterol Hepatol**, v. 11, p. 76-86, 2014.
- ALBENSI, B. C.; MATTSON, M. P. Evidence for the involvement of TNF and NF-kappaB in hippocampal synaptic plasticity. **Synapse**, v. 35, p. 9-151, 2010.
- ALBERTAZZI, P. Purified phytoestrogens in postmenopausal bone health: is there a role for genistein. **Climacteric**, v. 5, p. 190-196, 2002.
- ALDERTON, W. K.; COOPER, C. E.; KNOWLES, R. G. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. **Biochemical Journal**, p. 593-615, 2001.
- ALI, S. F.; BINIENDA, Z. K.; IMAM, S. Z. Molecular Aspects of Dopaminergic Neurodegeneration: Gene-Environment Interaction in Parkin Dysfunction. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 8, n. 12, p. 4702-4713, 2011. doi:10.3390/ijerph8124702.
- AMEYAR, M.; WISNIEWSKA, M.; WEITZMAN, J. B. Um papel para a AP-1 em apoptose: o caso a favor e contra. **Bioquímica**, v. 85, p. 52-747, 2003.
- ANTONIO, G. D.; TESSER, C.; DALCANALE.; MORETTI-PIRES, R. O. Phytotherapy in primary health care. **Rev. Saúde Pública**, São Paulo, v. 48, n. 3, 2014.

AON, M. A.; CORTASSA, S.; AKAR, F. G.; O'ROURKE, B. Mitochondrial criticality: a new concept at the turning point of life or death. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1762, p. 232-240, 2006.

ARAÚJO, D. P.; SOUSA, C. N. S.; ARAÚJO, P. V. P.; MENEZES, C. E. S.; RODRIGUES, F. T. S.; ESCUDEIRO, S. S.; LIMA, N.B.C.; PATROCÍNIO, M.C.A.; AGUIAR, L. M. V.; VIANA, G. S. B.; VASCONCELOS, S. M. M. Behavioral and Neurochemical Effects of Alpha-Lipoic Acid in the Model of Parkinson's Disease Induced by Unilateral Stereotaxic Injection of 6-Ohda in Rat. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**. v. 2013, 2013. p. 13.

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

ATHAUDA, D.; FOLTYNIE, T. The ongoing pursuit of neuroprotective therapies in Parkinson disease. **Nat Rev Neurol**, v. 11, p. 25-40, 2015.

ATTA, K.; SINHA, S.; CHATTOPADHYAY, P. Reactive oxygen species in health and disease. **Natl Med J**, v. 13, p. 304-310, 2000.

AUTRY, A. E.; MONTEGGIA, L. M. Brain-derived Neurotrophic Factor and Neuropsychiatric Disorders. **Pharmacol. Rev**, v. 64, n. 2, p. 238-258, 2012.

AZIMI, H.; FALLAH-TAFTI, M.; KHAKSHUR, A. A.; ABDOLLAHI, M. A review of phytotherapy of acne vulgaris: perspective of new pharmacological treatments. **Fitoterapia**, v. 83, p. 17-1306, 2012.

BAILEY, C.E.; HAMMERS, D.W.; DEFORD, J.H.; DIMAYUGA, V.L.; AMANING, J.K.; FARRA, R.; PAPACONSTANTINIOU, J. Ischemia-reperfusion enhances GAPDH nitration in aging skeletal muscle. **Aging (Albany NY)**, v. 3. p. 1003-17, 2011.

BANNERMAN, D. M.; RAWLINS, J. N.; MCHUGH, S. B.; DEACON, R. M.; YEE, B. K.; BAST, T.; ZHANG, W. N.; POTHUIZEN, H. H.; FELDON, J. Regional dissociations within the hippocampus--memory and anxiety. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 28, p. 83-273, 2004.

BARBER, R. D.; HARMER, D. W.; COLEMAN, R. A.; CLARK, B. J. GAPDH as a housekeeping gene: analysis of GAPDH mRNA expression in a panel of 72 human tissues. **Physiol Genomics**, v. 21, p. 95-389, 2005.

BARTELS, A. L.; LEENDERS, K. L. Cyclooxygenase and Neuroinflammation in Parkinson's disease Neurodegeneration. **Curr. Neuropharm**, v. 8, p. 62-68, 2010.

BECK, V.; UNTERRIEDER, E.; KRENN, L.; KUBELKA, W.; Jungbauer A. Comparison of hormonal activity (estrogen, androgen and progestin) of standardized plant extracts for large scale use in hormone replacement therapy. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 84, n. 2-3, p. 68-259, 2003.

BEDELL, S.; NACHTIGALL, M.; NAFTOLIN, F. The pros and cons of plant estrogens for menopause. **J Steroid Biochem Mol Biol**, v. 139, p. 225-236, 2014.

BEER A. M.; NEFF, A. Differentiated Evaluation of Extract-Specific Evidence on *Cimicifuga racemosa*'s Efficacy and Safety for Climacteric Complaints. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, 2013. p. 21.

BJORKLUND, T. KORDOWER, J., H. Gene therapy for Parkinson's disease. **Mov Disord**, v. 25 n.1, p. S161-173, 2010. doi: 10.1002/mds.22785.

BLANCHARD, D. C.; BLANCHARD, R. J. An ethoexperimental approach to the biology of emotions. **Ann Rev Psychol**, v. 39, p. 43-68, 1998.

BOGDAN, C. Nitric oxide and the immune response. **Nature Immunology**, v. 2 p. 907-916, 2001.

BOISSIER, J. R.; SIMON, P. Dissociation de deux composantes dans le compartiment d'investigation de la souris. **Arch. Int. Pharmacodyn**, v. 147, p. 372-387, 1964. Apud TAKEDA, H.; TSUJI, M.; MATSUMIYA, T. Changes in head-dipping behavior in the hole-board test reflect the anxiogenic and/or anxiolytic state in mice. **Eur. J. Pharmacol**, v. 350, p. 21-29, 1998.

BOLLE, P.; MASTRANGELO, S.; PERRONE, F.; Evandri MGEstrogen-like effect of a *Cimicifuga racemosa* extract sub-fraction as assessed by in vivo, ex vivo and in vitro assays. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 107, n. 3-5, p. 9-262, 2007.

BOURIN, M.; CHENU, F.; RIPOLL, N.; DAVID, D. J. P. A proposal of decision tree to screen putative antidepressants using forced swim and tail suspension test. **Behav. Brain Res**, v.164, p. 266-269, 2005.

BOVÉ, J.; PERIER, C. Review: Neurotoxin-based models of Parkinson's disease. **Neuroscience**, v.21, p. 51-76, 2012.

BRANDT, B.; ABOU-ELADAB, E. F.; TIEDGE, M.; WALZEL, H. Role of the JNK/c-Jun/AP-1 signaling pathway in galectin-1-induced T-cell death. **Cell Death and Disease**, v. 1, n. 23, 2010.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Lista de medicamentos fitoterápicos de registro simplificado**. Instrução normativa nº 89, de 11 de dezembro de 2008.

_____. Ministério da Saúde, Secretaria de Políticas de Saúde. Portal Brasil. **Conheça os Sintomas do Mal de Parkinson**. Brasília: Ministério da Saúde, 2014.

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de atenção básica. **Envelhecimento e saúde da pessoa idosa**. Brasília: Ministério da Saúde. p. 192, 2011a.

_____. Ministério da Saúde, Secretaria de Políticas de Saúde. **Boletim Epidemiológico**. Brasília: Ministério da Saúde, 2011b.

BRAY, T. M.; TAYLOR, C. G. Tissue glutathione, nutrition and oxidative stress. **Can J Physiol Pharmacol**, v. 71, p. 746-751, 1993.

BRIESE, V.; STAMMWITZ, U.; FRIEDE, M. Black cohosh with or without st. john's wort for symptom-specific climacteric treatment--results of a large-scale, controlled, observational study. **Maturitas**, v. 57, p. 405-414, 2007.

BROOM, L.; MARINOVA-MUTAFCHIEVA, L.; SADEGHIAN, M.; DAVIS, J. B.; MEDHURST, A. D.; DEXTER, D. T. Neuroprotection by the selective iNOS inhibitor GW274150 in a model of Parkinson disease. **Free Radic Biol Med**, v. 50, p. 633-640, 2011.

BULLITT, E. Expression of c-fos-like protein as a marker for neuronal activity following noxious stimulation in the rat. **J Comp Neurol**, V. 296, n. 4, p. 517-530, 1990.

CACHOPE, R.; CHEER. Local control of striatal dopamine release. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, 2014.

CALDEIRA, M. V.; MELO, C. V.; PEREIRA, D. B.; CARVALHO, R. F.; CARVALHO, A. L.; DUARTE, C. B. BDNF regulates the expression and traffic of NMDA receptors in cultured hippocampal neurons. **Mol Cell Neurosci**, v. 35, p. 19-208, 2007.

CAO, J. P.; NIU, H. Y.; WANG, H. J.; HUANG, X. G.; GAO, D. S. NF- κ B p65/p52 plays a role in GDNF up-regulating Bcl-2 and Bcl-w expression in 6-OHDA-induced apoptosis of MN9D cell. **Int J Neurosci**, v. 123, p. 10-705, 2013.

CAO, K.; CHEN-PLOTKIN, C.; PLOTKIN, J. B.; WANG, L. Age-Related Gene Expression in Normal and Neurodegenerative Human Brain Tissues. **Plos one**, v. 5, n. 9, 2010.

CARLINI, E. A.; BURGOS, V. Screening farmacológico de ansiolíticos: metodologia laboratorial e comparação entre o diazepam e o clorobenzapam. **Revista da Associação Brasileira de Psiquiatria**, v. 1, p. 25-31, 1979.

CARLINI, E. A. "Screening" farmacológico de plantas brasileiras. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 32, p. 265-274, 1972.

CASSANO, P.; HIDALGO, A.; BURGOS, V.; ADRIS, S.; ARGIBAY, P. Hippocampal upregulation of the cyclooxygenase-2 gene following neonatal clomipramine treatment (a model of depression). **Pharmacogenomics J**, v. 6, p. 381-387, 2006.

CHALOVICH, E. M.; ZHU, J.; CALTAGARONE, J.; BOWSER, R.; CHU, C. T. Functional Repression of cAMP Response Element in 6-Hydroxydopamine-treated Neuronal Cells. **The Journal of biological chemistry**, v. 281, p. 17870-17881, 2006.

CHOI, W. S.; KRUSE, S. E.; PALMITER, R. D.; XIA, Z. Mitochondrial complex I inhibition is not required for dopaminergic neuron death induced by rotenone, MPP+, or paraquat. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, p. 15136-15141, 2008.

CHOMCZYNSKI, P.; SACCHI, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol- chloroform extraction. **Anal Biochem**, v. 162, p. 9-156, 1987.

CHRISTMAS, D.; HOOD, S.; NUTT, D. Potential Novel Anxiolytic Drugs. **Current Pharmaceutical Design**, v. 14, p. 3534-3546, 2008.

CHOTIBUT, T.; APPLE, D. M.; JEFFERIS, R.; SALVATORE, M. F. Dopamine Transporter Loss in 6-OHDA Parkinson's Model Is Unmet by Parallel Reduction in Dopamine Uptake. **PLoS ONE**, v. 7, n. 12, 2012. doi:10.1371/journal.pone.0052322.

CHUKHLOVINA, M. L. Pathogenetic mechanisms of dementia in the older patients with Parkinson's diseases. **Zh Nevrol Psikhiatr Im S S Korsakova**. v.114, p.79-82. 2014;

CLARK, G.; KOSTER, A. G.; PERSON, D. W. **Psychopharmacology**, v. 20, p. 71-169, 1971.

COLLINS, L. M.; TOULOUSE, A.; CONNOR, T. J.; NOLAN, Y. M. Contributions of central and systemic inflammation to the pathophysiology Parkinson's disease. **Neuropharmacology**, v. 62, p. 2154-2168, 2012.

CONNOR, T. J.; KELLIHER, P.; SHEN, Y.; HARKIN, A.; KELLY, J. P.; LEONARD, B. E. Effect of subchronic antidepressant treatments on behavioral, neurochemical, and endocrine changes in the forced-swim test. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 65, p. 591-597, 2000.

CORVINO, V.; MARCHESI, E.; GIANNETTI, S.; LATTANZI, W.; BONVISSUTO, D.; BIAMONTE, F.; MONGIOVÌ, A. M.; GELOSO, M. C. The neuroprotective and neurogenic effects of neuropeptide Y. Administration in an animal model of hippocampal neurodegeneration and temporal lobe epilepsy induced by trimethyltin. **J. Neurochem**, 2012.

CRAWLEY, J. N. Exploratory behavior models of anxiety in mice. **Neurosci. Biobehav. Rev**, v. 9, p. 37-44, 1985.

CUNHA, R. M. S. **Alterações no perfil de expressão de genes em células hipocâmpais de camundongos (*Mus musculus*) induzidas por lectinas de *Canavalia brasiliensis* (ConBr) e *Vatairea macrocarpa* (VML) sugerem diferentes efeitos sobre a neuroplasticidade.** 2010. 162f. Tese (Doutorado em Bioquímica) - Universidade Federal do Ceará, Ceará, 2010.

DAUER, W.; PRZEDBORSKI, S. Parkinson's disease: mechanisms and models. **Neuron**, v. 39, n. 6, p.889-909, 2003.

DAVID, D. J.; BOURIN, M.; HASCOET, M.; COLOMBEL, M. C.; BAKER, G. B.; JOLLIET, P. Comparison of antidepressant activity in 4- and 40-week-old male mice in the forced swimming test: involvement of 5-HT1A and 5-HT1B receptors in old mice. **Psychopharmacology**, Berlin, v. 153, p. 443-449, 2001.

DENG, S.; MAY, B. H.; ZHANG, A. L.; LU, C.; XUE, C. C. Phytotherapy in the management of psoriasis: a review of the efficacy and safety of oral interventions and the pharmacological actions of the main plants. **Arch Dermatol Res**, v. 306, p. 29-211, 2014.

DETKE, M. J.; RICKELS, M.; LUCKI, I. Active behaviors in the rat forced swimming test differentially produced by serotonergic and noradrenergic antidepressants. **Psychopharmacology**, Berlin, v. 121, p. 66-72, 1995.

DEWIK, P. M. Medicinal Natural Products. In: JOHN, W.; SONS. **A Biosynthetic Approach**. 2. ed. Chichester, 2002.

DEXTER, D. T.; JENNER, P. Parkinson's disease: from pathology to molecular disease mechanisms. **Free Radical and Medicine**, p. 1-13, 2013.

DHARA, A.; PAL, S.; NAGCHAUDHURI, A. K. Psychopharmacological Studies on *Tragia Involucrate* Root Extract. **Phytotherapy Research**, v. 16, p. 326-330, 2002.

DOUBLE, K. L. Neuronal vulnerability in Parkinson's disease. **Parkinsonism & Related Disorders**, v. 18, n. 1, p. 53-54, 2012.

DRAGO, F.; CONTARINO, A.; BUSA, L. The expression. Of neuropeptide-induced excessive *grooming* behavior in dopamine D1 and D2 receptor-deficient mice. **Eur. J. Pharmacol**, v. 365, p. 125-131, 1999.

DRAPER, H. H.; HADLEY, M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. **Methods Enzymol**, v. 186, p. 31-421, 1990.

DSM-IV. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 4. ed. **American Psychiatric Association**, Washington, DC, 1994.

DUAN, X.; TONG, J.; XU, Q.; WU, Y.; CAI, F.; LI, T.; SONG, W. Upregulation of human PINK1 gene expression by NF κ B signalling. **Mol Brain**, 2014.

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, n. 3, 1957. p. 208.

DUNN, A. J. Benzodiazepines decrease *grooming* in response to novelty but not ACTh or beta-endorphin. **Pharmacol. Biochem. Behav**, v. 15, p. 605-608, 1981.

DURRENBERGER, P. F.; GRÜNBLATT, E.; FERNANDO, F. S.; MONORANU, C. M.; EVANS, J.; RIEDERER, P.; REYNOLDS, R.; DEXTER, D. T. Inflammatory Pathways in Parkinson's Disease; A BNE Microarray Study. **Parkinsons Dis**, 2012.

DUTY, S.; JENNER, P. Animal models of Parkinson's disease: a source of novel treatments and clues to the cause of the disease. **British J. Pharmacol**, v. 164, p. 1357-1391, 2011.

EGHBALI, M.; CURMI, J. P.; BIRNIR, B.; GAGE, P. W. Hippocampal GABA(A) channel conductance increased by diazepam. **Nature**, v. 338, p. 5-71, 1997.

EINBOND, L. S.; WEN-CAI, Y.; HE, K.; WU, H.; CRUZ, E.; ROLLER, M.; KRONENBERG, F. Growth inhibitory activity of extracts and compounds from *Cimicifuga* species on human breast cancer cells. **Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology**, v. 15, p. 504-511, 2008.

EINBOND, L. S.; SHIMIZU, M.; XIAO, D.; NUNTANAKORN, P.; LIM, J. T.; SUZUI, M.; SETER, C.; PERTEL, T.; KENNELLY, E. J.; KRONENBERG, F.; WEINSTEIN, I. B. Growth inhibitory activity of extracts and purified components of black cohosh on human breast cancer cells. **Breast Cancer Res Treat**, v. 83, p. 31-221, 2004.

EL-ABHAR.; HANAN, S.; SCHAALAN, M. F. Phytotherapy in Diabetes: Review on Potential Mechanistic Perspectives. **World Journal of Diabetes**, p. 176-197, 2014.

ESPEJO, E. F. Structure of the mouse behavior on the elevated plus-maze test of anxiety. **Behav. Brain Res**, v. 86, p. 105-112, 1997.

ESTEVEZ, C. L.; VERMA, M.; RÓG-ZIELIŃSKA, E.; KELLY, V.; SAI, S.; BRETON, A.; DOUNADEU, F.; SECKL, J.; CHAMPAN, R.; Pro-Inflammatory Cytokine Induction of 11 β -hydroxysteroid Dehydrogenase Type 1 in A549 Cells Requires Phosphorylation of C/EBP β at Thr235. **Plos One**, v. 9, 2013.

FERREIRA, T. S.; MOREIRA, C. Z.; CÁRIA, N. Z.; VICTORIANO, G. I.; SILVA JR, W. F.; MAGALHÃES, J. C. Phytotherapy: an introduction to its history, use and application. **Rev. bras. plantas med.** Botucatu, v. 16, n. 2, 2014.

FEUSNER, J. D.; HEMBACHER, E. B. A.; PHILLIPS, K. A. The Mouse Who Couldn't Stop Washing: Pathologic Grooming in Animals and Humans. **CNS Spectr**, v. 14, n. 9, p. 13-503, 2009.

FISK, W. A.; LEV-TOV, H. A.; SIVAMANI, R. K. Botanical and Phytochemical. Therapy of Acne: A Systematic Review. **Phytother. Res**, v. 28, p. 1137-1152, 2014.

FORTUNATO, J.J.; RÉUS, G. Z.; KIRSCH, T. R.; STRINGARI, R. B.; FRIES, G. R.; KAPCZINSKI, F.; HALLAK, J. E.; ZUARDI, A. W.; CRIPPA, J. A.; QUEVEDO, J. Chronic administration of harmine elicits antidepressant-like effects and increases BDNF levels in rat hippocampus. **J Neural Transm**, v.117, n. 10, p.1131-1137, 2010. doi: 10.1007/s00702-010-0451-2.

FRANK-CANNON, T. C.; ALTO, L. T.; McALPINE, F. E.; TANSEY, M.G. Does neuroinflammation fan the flame in neurodegenerative diseases. **Mol. Neurodegener**, v. 4, n. 47, p. 1-13, 2009.

GALINDO, M. F.; SOLESIO, M. E.; ATIENZAR-AROCA, S.; ZAMORA, M. J.; BUESO J. J. Mitochondrial dynamics and mitophagy in the 6-hydroxydopamine preclinical model of Parkinson's disease. **Parkinson Dis**, 2012.

GAUBE, F.; WOLF, L. S.; PUSCH, L.; KROLL, T. C.; HAMBURGER, M. Gene expression profiling reveals effects of *Cimicifuga racemosa* (L.) NUTT. (black cohosh) on the estrogen

receptor positive human breast cancer cell line MCF-7. **BMC Pharmacology**, v. 20, p. 7-11 2007.

GERLAI, R. Phenomics: fiction or the future. **Trends Neurosci**, v. 25, p. 506-509, 2002.

GILGUN-SHERKI, Y.; MELAMED, E.; OFFEN, D. Oxidative stress induced-neurodegenerative diseases: the need for antioxidants that penetrate the blood brain barrier. **Neuropharmacol**, v. 40, p. 959-975, 2001.

GILMORE, T. D. The Rel/NF-kappaB signal transduction pathway: introduction. **Oncogene**, v. 18, p. 4-6842, 1999.

GOLAN, D. E. **Princípios de Farmacologia. Farmacologia da Neurotransmissão GABAérgica e Glutamatérgica. Guanabara Koogan**. 3. ed, 2009.

GOMEZ-LAZARO, M.; GALINDO, M.F.; CONCANNON, C. G.; SEGURA, M. F.; FERNANDEZ-GOMEZ, F. J.; LLECHA, N.; COMELLA, J. X.; PREHN, J. H.; JORDAN, J. 6-Hydroxydopamine activates the mitochondrial apoptosis pathway through p38 MAPK-mediated, p53-independent activation of Bax and PUMA. **J Neurochem**, v. 104, p. 612-1599, 2008.

GONZÁLEZ, M. I. Brain-derived neurotrophic factor promotes gephyrin protein expression and GABAA receptor clustering in immature cultured hippocampal cells. **Neurochem Int**, v. 72, p. 14-21, 2014.

GOODMAM, L. S.; GILMAN, A. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 11. ed. Rio de Janeiro: McGraw Hill, 2012.

GOOD, P.P. **The family flora and materia medica botanica**, v. 2: t. 79. 1845.

GOTTESMANN, C. GABA mechanisms ans sleep. **Neurosci**, v.111, n. 2, p. 231-239, 2002.

GRAEFF, F. G.; SILVA, M.; BEN, C. M.; ZUARDI, A. W.; HETEM, L. A. B.; GUIMARÃES, F. S. Comparison between two models of experimental anxiety in healthy volunteers and panic disorder patients. **Neuro. Biohav. Reviews**, v. 25, p. 753-759, 2001.

GREALISH, S.; MATTSSON, B.; DRAXLER, P.; BJÖRKLUND, A. Characterisation of behavioural and neurodegenerative changes induced by intranigral 6-hydroxydopamine lesions in a mouse model of Parkinson's disease. **Eur J Neurosci**, v. 31, p. 78-2266, 2010.

GREEN, L. C.; TANNEMBAUN, S. R.; GOLDMAN, P. Nitrate synthesis in the germfree and conventional rat. **Science**, v. 212, p. 8-56, 1981.

GREENGARD, P. The neurobiology of slow synaptic transmission. **Science**, v. 294, p. 30-1024, 2001.

GUEDES, R. P.; SILVA, C. G. Inflammation in the pathogenesis and progression of neurological diseases. **Ciência em Movimento**, n. 24, p. 34-48, 2010.

HAN, K. K.; SOARES JR, J.M.; HAIDAR, M.A.; DE LIMA, G.R.; Baracat ECBenefits of

- soy isoflavone therapeutic regimen on menopausal symptoms. **Obstet Gynecol**, v. 99, 2002.
- HALL, C. S. Emotional behavior in the rat: I. Defecation and urination as measures of individual differences in emotionality. **J Comp Psychol**, v. 18, p. 385-403, 1934.
- HANDLEY, S. L.; MITHANI, S. Effects of alpha-adrenoceptor agonist and antagonists in a maze-exploration of fear-motivated behaviour. *Naunyn-Schmied. Arch. Pharmacol*, v. 327, p. 1-5, 1984.
- HE, B.; BA, Y.; WANG, X.; LIU, S.; LIU, G.; OU, S.; GU, Y.; PAN, X.; WANG, T. BDNF expression with functional improvement in transected spinal cord treated with neural stem cells in adult rats. **Neuropeptides**, 2013.
- HEFTI, F.; MELAMED, E.; SAHAKIAN, B. J.; WURTMAN, R. J. Circling behavior in rats with partial, unilateral nigro-striatal lesions: effect of amphetamine, apomorphine, and L-DOPA. **Pharmacol. Biochem. Behav**, v. 12, p. 185-188, 1980.
- HERCULANO-HOUZEL S. The remarkable, yet not extraordinary, human brain as a scaled-up primate brain and its associated cost. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 2012.
- HERTSENS, R. C.; JACOB, W. A. Freeze-fracture study of heart mitochondria in the condensed or orthodox state. **Biochim Biophys Acta**, v. 894, p. 507-514, 1987.
- HESS, J.; ANGEL, P.; SCHORPP-KISTNER, M. AP-1 subunidades: Discussão e harmonia entre irmãos. **J. Cell. Sci**, v. 117, 2004. p. 25.
- HO, Y. S.; POON, D. C.; CHAN, T. F.; CHANG, R. C. From small to big molecules: how do we prevent and delay the progression of age-related neurodegeneration. **Curr. Pharm. Des**, v. 18, n. 1, p. 15-26, 2012.
- HOFMAN, M. A. Evolution of the human brain: when bigger is better. **Frontiers in Neuroanatomy**, v. 8, n. 15, 2014.
- HOGG, S. A review of the validity and variability of the elevated plus-maze as an animal model of anxiety. **Pharmacol. Biochem. Behav**, v. 54, p. 21-30, 1996.
- HOLMES, P. V. Rodent models of depression: reexamining validity without anthropomorphic interference. **Crit Rev Neurobiol**, v. 15, p. 142-174, 2003.
- HOSTANSKA, K.; NISSLEIN, T.; FREUDENSTEIN, J.; REICHLING, J.; SALLER, R. Apoptosis of human prostate androgen-dependent and -independent carcinoma cells induced by an isopropanolic extract of black cohosh involves degradation of cytokeratin (CK) 18. **Anticancer Research**, v. 25, n. 1A, p. 47-139, 2005.
- HUANG, T. L.; HUNG, Y. Y. Lorazepam reduces the serum brain-derived neurotrophic factor level in schizophrenia patients with catatonia. **Progress in Neuropsychopharmacol and Biological Psychiatry**, v. 33, 2009. p. 159.

HUOPANIEMI, L.; KEIST, R.; RANDOLPH, A.; CERTA, U.; RUDOLPH, U. Diazepam-induced adaptive plasticity revealed by $\alpha 1$ GABAA receptor-specific expression profiling. **J Neurochem**, v. 88, p. 1059-1067, 2004.

INSTITUTO DE CIENCIA E TECNOLOGIA APLICADA. **Novo fitoterápico com ação anti-inflamatória**. Disponível em: <<http://ictq.com.br/portal/noticias/novo-fitoterapico-com-acao-anti-inflamatoria--1523>. Acessado em 20/01/2015.> Acesso em: 20 jan. 2015.

IWASAKI, Y.; GAY, B.; WADA, K.; KOIZUMI, S. Association of the Src family tyrosine kinase Fyn with TrkB. **J. Neurochem**, v. 71, p. 11-106, 1998.

JANN, M.V. Diagnosis and treatment of bipolar disorders in adults: a review of the evidence on pharmacologic treatments. **AM HEALTH DRUG BENEFITS**, v. 7. p. 99-489, 2014.

JANHSEN, K.; ROSER, P.; HOFFMANN, K. The problems os long-term with benzodiazepines and related substance. **Dtsch Arztebl Int**, v. 5, n. 112, p. 1-7, 2015.

JARVELA, J. T.; LOPEZ-PICON, F. R.; PLYSJUK, A.; RUOHONEN, S.; HOLOPAINEN, I. E. Temporal profiles of age-dependent changes in cytokine mRNA expression and glial cell activation after status epilepticus in postnatal rat hippocampus. **J. Neuroinflam**, v. 8, n. 2, p. 1-12, 2011.

JING, X.; SHI, H.; ZHANG, C.; REN, M.; HAN, M.; WEI, X.; ZHANG, X. LOU, H. Dimethyl fumarate attenuates 6-OHDA-induced neurotoxicity in SH-SY5Y cells and in animal model of Parkinson's disease by enhancing Nrf2 activity. **Neuroscience**, v. 12, n. 286, p.131-140, 2015. doi: 10.1016/j.neuroscience.2014.11.047.

JUHASZOVA, M.; ZOROV, D. B.; KIM, S. H.; PEPE, S.; FU, Q.; FISHBEIN, K. W.; ZIMAN, B. D.; WANG, S.; YTREHUS, K.; ANTOS, C. L.; OLSON, E. N.; SOLLOTT, S. J. Glycogen synthase kinase-3 β mediates convergence of protection signaling to inhibit the mitochondrial permeability transition pore. **J. Clin. Invest**, v. 113, p. 1535-1549, 2004.

JULIO-PIEPER, M.; BRAVO, J.A.; ALIAGA, E.; GOTTELAND, M. Review article: intestinal barrier dysfunction and central nervous system disorders--a controversial association. **Aliment Pharmacol Ther**, v. 40, p. 201-1187, 2014

KALUEFF, A. V.; TUOHIMAA, P. The *grooming* analysis algorithm discriminates between different levels of anxiety in rats: potential utility for neurobehavioural stress research. **Journal of Neuroscience Research**, v. 143, p. 169-177, 2005.

KANAI, Y.; HEDIGER, M. A. The glutamate/neutral amino acid transporter family SLC1: molecular, physiological and pharmacological aspects. **Pflugers Arch**, v. 447, p. 79-469, 2004.

KARIN, M. Too many transcription factors: positive and negative interactions. **New Biol**, v. 2, p. 31-126, 1990.

KARLSSON, R. M.; TANAKA, K.; SAKSIDA, L. M.; BUSSEY, T. J.; HEILIG, M.; HOLMES, A. Assessment of glutamate transporter GLAST (EAAT1)-deficient mice for

phenotypes relevant to the negative and executive/cognitive symptoms of schizophrenia. **Neuropsychopharmacology**, v. 34, p. 89-1578, 2009.

KEMEN, A. C.; HONKANEN, S.; MELTON, R. E.; FINDLAY, K. C.; MUGFORD, S. T.; HAYASHI, K., HARALAMPIDIS, K., ROSSER, R., J., OSBOURN, A. Investigation of triterpene synthesis and regulation in oats reveals a role for β -amyrin in determining root epidermal cell patterning. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 111, n. 8679–8684, 2014. doi:10.1073/pnas.1401553111.

KIM, D. H.; KIM, S.; JEON, S. J.; SON, K. H., LEE, S. Tanshinone I enhances learning and memory, and ameliorates memory impairment in mice via the extracellular signal-regulated kinase signaling pathway. **Br J Pharmacol**, v. 158, p. 1131-1142, 2009.

KIM, Y. S.; JOO, W. S.; JIN, B. K.; CHO, Y. H.; BAIK, H. H.; PARK, C. W. Melatonin protects against 6-OHDA-induced neuronal death of nigrostriatal dopaminergic system. **Neuroreport**, v. 9, p. 2387-2390, 1998.

KLEINGEIST, B. Isolation and pharmacological characterization of microsomal human liver flumazenil carboxylesterase. **J Pharm Pharm Sci**, v. 1, n. 1, p. 38-46, 1998.

KLIGLER, B. Black Cohosh. **Am Fam Physician**, v. 68, n. 1, p. 114-116, 2002.

KNOWLES, R. G.; MONCADA, S. Nitric oxide synthases in mammals. **Biochem. J**, v. 298, p. 58-249, 1994.

KOPRICH, J. B.; RESKE-NIELSEN, C.; MITHAL, P.; ISACSON, O. Neuroinflammation mediated by IL-1 β increases susceptibility of dopamine neurons to degeneration in an animal model of Parkinson's disease. **J Neuroinflammation**, 2008.

KOWALTOWSKI, A. J.; COSSO, R. G.; CAMPOS, C. B.; FISKUM, G. Effect of Bcl-2 overexpression on mitochondrial structure and function. **J. Biol. Chem**, v. 277, p. 42802-42807, 2002.

KOWALTOWSKI, A. J.; CASTILHO, R. F.; VERCESI, A. E. Mitochondrial permeability transition and oxidative stress. **FEBS Lett**, v. 495, p. 12-15, 2001.

KRINSKY, D. L. **Natural Therapeutics Pocket Guide**. 2. ed. Hudson: Lexi-Comp, 2003.

KRALL, J.; BALLE, T.; KROGSGAARD-LARSEN, N.; SØRENSEN, T.E.; KROGSGAARD-LARSEN, P.; KRISTIANSEN, U.; FRØLUND, B. GABAA Receptor Partial Agonists and Antagonists: Structure, Binding Mode, and Pharmacology. **Adv Pharmacol**, v.72, p. 27- 201, 2015.

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

KUBERA, M.; OBUCHOWICS, E.; GOEHLER, L.; BRZESZCZ, J.; MAES, M. In animal models, psychosocial stress-induced (neuro) inflammation, apoptosis and reduced neurogenesis are associated to the onset of depression. **Biol. Psychiatry**, v. 35, n. 3, p. 159-744, 2011.

KUNG, J. C.; CHEN, T. C.; SHYU, B. C.; HSIAO, S.; HUANG, A. C. Anxiety- and depressive-like responses and c-fos activity in preproenkephalin knockout mice: oversensitivity hypothesis of enkephalin deficit-induced posttraumatic stress disorder. **J Biomed Sci**, 2010.

LATCHMAN, D. S. Transcription factors: an overview. *Int. J. Biochem. Cell Biol*, v. 29, p. 12-1305, 1997.

LEA, P. M.; CUSTER, S. J.; VICINI, S.; FADEN, A. I. Neuronal and glial mGluR5 modulation prevents stretch-induced enhancement of NMDA receptor current. **Pharmacol. Biochem. Behav**, v. 73, p. 98-287, 2002.

LEAL, M. C.; CASABONA, J. C.; PUNTEL, M.; PITOSI, F. J. Interleukin-1 β and tumor necrosis factor- α : reliable targets for protective therapies in Parkinson's Disease? **Front Cell Neurosci**, 2013.

LEE, Y.; SON, H.; KIM, G.; KIM, S.; LEE, D. H.; ROH, G. S.; KANG, S. S.; CHO, G. J.; CHOI, W. S.; KIM, H. J. Glutamine deficiency in the prefrontal cortex increases depressive-like behaviours in male mice. **J Psychiatry Neurosci**, v. 38, p. 91-183, 2013.

LEHRE, K. P.; LEVY, L. M.; OTTERSEN, O. P.; STORM-MATHISEN, J.; DANBOLT, N. C. Differential expression of two glial glutamate transporters in the rat brain: quantitative and immunocytochemical observations. **The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 15, p. 53-1835, 1995.

LENT, R. **Cem Bilhões de Neurônios**: conceitos fundamentais de neurociências. Rio de Janeiro: Atheneu, 2004.

LI, R.; LIANG, T.; XU, L.; ZHENG, N.; ZHANG, K.; DUAN, X. Puerarin attenuates neuronal degeneration in the substantia nigra of 6-OHDA-lesioned rats through regulating BDNF expression and activating the Nrf2/ARE signaling pathway. **Brain Res**, p. 1-9, 2013.

LI, M.; DAI, F. R.; DU, X. P.; YANG, Q. D.; CHEN, Y. Neuroprotection by silencing iNOS expression in a 6-OHDA model of Parkinson's disease. **J Mol Neurosci**, v. 48, p. 33-225, 2012.

LI, Q.; VERMA, I. M. NF-kappaB regulation in the immune system. **Nat. Rev. Immunol**, v. 2, p. 34-725, 2002.

LICATA, S. C.; SHINDAY, N. M.; HUIZENGA, M. N.; DARNELL, S. B.; SANGREY, G. R.; RUDOLPH, U.; ROWLETT, J. K.; SADRI-VAKILI, G. Alterations in brain-derived neurotrophic factor in the mouse hippocampus following acute but not repeated benzodiazepine treatment. **PLoS One**, 2013.

LINDER, J. L.; STENLUND, H.; FORSGREN, L. Incidence of Parkinson's disease and parkinsonism in Northern Sweden: A population based-study. **Movement Disorders**, v. 25, n. 3, p. 341-348, 2010.

LING X.; BOCHU, W. A review of phytotherapy of gout: perspective of new pharmacological treatments. **Pharmazie**, v. 69, p. 56-243, 2014.

LISTER, R. G. Ethologically based animal models of anxiety disorders. **Pharmacol Ther**, v. 46, p. 40-321, 1990.

_____. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. **Psychopharmacology**, v. 92, p. 5-180, 1987.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(Delta Delta C (T) Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001.

LOPES, C. M. C.; CELESTINO, C. A.; HAYASHIDA, S. A. Y.; HALBE, H. W.; DOLCE, R. B.; CORREA, L. Função hepática em mulheres menopausadas tratadas com extrato seco padronizado do rizoma e raízes de *Cimicifuga racemosa* L. **Revista Brasileira de Medicina**, v. 66, n. 8, p. 254-259, 2009.

LORENZ, K. Z. Os fundamentos da etologia (Tradução de Pedro Melo Cruz e Carlos Alberts). São Paulo: Unesp; 1995. (Trabalho original publicado em 1981).

LU, X.; KIM-HAN, J.S.; HARMON, S.; SAKIYAMA-ELBERT, S.E.; O'MALLEY, K.L. The Parkinsonian mimetic, 6-OHDA, impairs axonal transport in dopaminergic axons. **Mol Neurodegener**, v. 3, p. 9-17, 2014.

LUDKA, F. K.; ZOMKOWSKI, A. D.; CUNHA, M. P.; DAL-CIM, T.; ZENI, A. L.; RODRIGUES, A. L.; TASCA, C. I. Acute atorvastatin treatment exerts antidepressant-like effect in mice via the L-arginine-nitric oxide-cyclic guanosine monophosphate pathway and increases BDNF levels. **Eur Neuropsychopharmacol**, v. 23, n. 5, p. 12-400, 2013.

LYON, L.; KEW, J.N.; CORTI, C.; HARRISON, P.J.; BURNET, P.W. Altered hippocampal expression of glutamate receptors and transporters in GRM2 and GRM3 knockout mice. **Synapse (New York, N.y.)**, v. 62, n. 11, p.842-850, 2008. doi:10.1002/syn.20553.

MAHADY, G. B. Black cohosh (*Actaea/Cimicifuga racemosa*): review of the clinical data for safety and efficacy in menopausal symptoms. **Treatments in Endocrinology**, v. 4, n. 3, p. 84-177, 2005.

MAIA, S.; ARLICOT, N.; VIERRON, E.; BODARD, S.; VERGOTE, J.; GUILLOTEAU, D.; CHALON, S. Longitudinal and parallel monitoring of neuroinflammation and neurodegeneration in a 6-hydroxydopamine rat model of Parkinson's disease. **Synapse**, v. 66, p. 573-583, 2012.

MANNELA, C. A.; PARSONS, D. F. Small-angle X-ray scattering from mitochondria. **Biochim Biophys Acta**, v. 470, p. 242-250, 1977.

MAO, Q. Q.; IP, S. P.; TSAI, S. H.; CHE, C. T. Antidepressant-like effect of peony glycosides in mice. **J. Ethnopharmacol**, v. 119, n. 2, p. 272-275, 2008.

MATRISCIANO, F.; STORTO, M.; NGOMBA, R. T.; CAPPUCIO, I.; CARICASOLE, A.; SCACCIANOCE, S.; RIOZZI, B.; MELCHIORRI, D.; NICOLETTI, F. Imipramine treatment up-regulates the expression and function of mGlu2/3 metabotropic glutamate receptors in the rat hippocampus. **Neuropharmacology**, v. 42, p. 15-1008, 2002.

MASADA-ATSUMI, S.; KUMETA, Y.; TAKAHASHI, Y.; HAKAMATSUKA, T.; GODA, .Y.; A Evaluation of the Botanical Origin of Black Cohosh Products by Genetic and Chemical Analyses. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 37, p. 454-460, 2014

MATTHEWS, K.; CHRISTMAS, D.; SWAN, J.; SORRELL, E. Animal models of depression: navigating through the clinical fog. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 29, p. 503-513, 2005.

MCDOWELL, K.; CHESSELET, M. F. Animal models of the non-motor features of Parkinson's disease. **Neurobiology of Disease**, v. 46, p. 597–606, 2012.

MATTSON, M. P. Superior pattern processing is the essence of the evolved human brain. **Frontiers in Neuroscience**, v. 8, n. 265, 2014.

MCQUADE, J. M.; TAMASHIRO, K. L.; WOOD, G. E.; HERMAN, J. P.; MCEWEN, B. S.; SAKAI, R. R.; ZHANG, J.; XU, M. Deficient hippocampal c-fos expression results in reduced anxiety and altered response to chronic stress in female mice. **Neurosci Lett**, v. 403, p. 30-125, 2006.

MEAKIN, S. O.; MACDONALD, J. I.; GRYZ, E. A.; KUBU, C. J.; VERDI, J. M. The signaling adapter FRS-2 competes with Shc for binding to the nerve growth factor receptor TrkA. A model for discriminating proliferation and differentiation. **J. Biol. Chem**, v. 274, p. 70-9861, 1999.

MEDEIROS, M. A.; REIS, L. C.; MELLO, L. E. Stress-induced c-Fos expression is differentially modulated by dexamethasone, Diazepam and imipramine. **Neuropsychopharmacology**, v. 30, n. 7, p. 56-1246, 2005.

MEISTER, A. Glutathione metabolism. **Methods Enzymol**, v. 251, p. 3-7, 1995.

MELO, F. H. C.; VENÂNCIO, E. T.; DE SOUSA, D. P.; FONTELES, M. M. F.; DE VASCONCELOS, S. M.; VIANA, G. S.; DE SOUSA, F. C. Anxiolytic-Like Effects of Carvacrol (5-isopropyl-2-methyphenol) in mice: involvement whit GABAergic transmission. **Fundam. Clin. Pharmacol**, v. 24, p. 437-443, 2010.

MENG, Z.; HU, J.; CHEN, J.; YUE, G. Xiaoyaosan Decoction, a Traditional Chinese Medicine, Inhibits Oxidative-Stress-Induced Hippocampus Neuron Apoptosis In Vitro. **Evid Based Complement Alternat Med**, 2012.

MICHAEL-TITUS, A. T.; BAINS, S.; JEETLE, J.; WHELPTON, R. Imipramine and phenelzine decrease glutamate overflow in the prefrontal cortex--a possible mechanism of neuroprotection in major depression. **Neuroscience**, v. 100, p. 4-681, 2000.

MIELNIK, C. A.; HORSFALL, W.; RAMSEY, A. J. Diazepam improves aspects of social behaviour and neuron activation in NMDA receptor-deficient mice. **Genes Brain Behav**, v. 13, p. 592-602, 2014.

MOHAMMAD-ALIZADEH-CHARANDABI, S.; SHAHNAZI, M.; NAHAEE, J.; BAYATIPAYAN, S. Efficacy of black cohosh (*Cimicifuga racemosa* L.) in treating early symptoms of menopause: a randomized clinical trial. **Chinese Medicine**, 2013.

MONTGOMERY, K. C. The relation between fear induced by novel stimulation and exploratory behavior. **J. Comp. Physiol. Psychol**, v. 48, n. 4, p. 254-260, 1955.

MOODY, T. W.; MERALI, Z.; CRAWLEY, J. N. The effects of anxiolytics and other agents on rat *grooming* behavior. **Ann. N. Y. Acad. Sci**, v. 90, p. 281-290, 1993.

MORALE, M. C.; SERRA, P. A.; L'EPISCOPO, F.; TIROLO, C.; CANIGLIA, S.; TESTA, N. Estrogen, neuroinflammation and neuroprotection in Parkinson's disease: glia dictates resistance versus vulnerability to neurodegeneration. **Neuroscience**, v. 38, p. 78-869, 2006.

MORIN, N.; JOURDAIN, V. A.; DI PAOLO, T. Modeling dyskinesia in animal models of Parkinson disease. **Exp Neurol**, v. 256, p.105-116, 2014. doi: 10.1016/j.expneurol.2013.01.024.

MOSER, V. C. Neurobehavioral screening in rodents. **Curr Protoc Toxicol**, 2001.

MOU, L.; HELDT, S. A.; RESSLER, K. J. Rapid brain-derived neurotrophic factor-dependent sequestration of amygdala and hippocampal GABA (A) receptors via different tyrosine receptor kinase B-mediated phosphorylation pathways. **Neuroscience**, p. 72-85, 2011.

MUKHERJEE, S.; MUKHERJEE, B.; MUKHOPADHYAY, R.; NASKAR, K.; SUNDAR, S.; DUJARDIN, J. C.; ROY, S. Imipramine exploits histone deacetylase 11 to increase the IL-12/IL-10 ratio in macrophages infected with antimony-resistant *Leishmania donovani* and clears organ parasites in experimental infection. **J Immunol**, v. 193, p. 94-4083, 2014.

MULLER, N.; MUNICH, D. E. Use of COX-2 Inhibitors for the Treatment of Schizophrenia, Delusional Disorders Affective Disorders, Autism or Tic Disorders, 2011.

MUROI, Y.; CZAJKOWSKI, C.; JACKSON, M. B. Local and global ligand-induced changes in the structure of the GABA(A) receptor. **Biochemistry**, v. 45, n. 23, p. 7013-7022, 2006.

MURPHY, M. P. How mitochondria produce reactive oxygen species. **Biochem J**, v. 417, p.1-13, 2009.

MURRAY, H. E.; PILLAI, A. V.; MCARTHUR, S. R.; RAZVI, N.; DATLA, K. P.; DEXTER, D. T. Dose- and sex-dependent effects of the neurotoxin 6-hydroxydopamine on the nigrostriatal dopaminergic pathway of adult rats: differential actions of estrogen in males and females. **Neuroscience**, v. 116, p. 22-213, 2003.

NAKAGAWARA, A.; LIU, X. G.; IKEGAKI, N.; WHITE, P. S.; YAMASHIRO, D. J.; NYCUM, L. M.; BIEGEL, J. A.; BRODEUR, G. M. Cloning and chromosomal localization

of the human TRK-B tyrosine kinase receptor gene (NTRK2). **Genomics**, v. 25, p. 46-538, 1995.

NAPPI, R. E.; MALAVASI, B.; BRUNDU, B.; FACHINETTI, F. Efficacy of *Cimicifuga racemosa* on climateric complaints: a randomized study versus low-dose transdermal estradiol. **Gynecol Endocrinol**, v. 20, p. 5-30, 2005.

NILES, L. P.; SMITH, L. J.; TENN, C. C. Modulation of c-fos expression in the rat striatum by Diazepam. **Neurosci Lett**, v. 236, p. 5-8, 1997.

NOLAN, G. P.; GHOSH, S.; LIOU, H. C.; TEMPST, P.; BALTIMORE, D. DNA binding and I kappa B inhibition of the cloned p65 subunit of NF-kappa B, a rel-related polypeptide. **Cell**, v. 64, p. 9-961, 1991.

NORDGREN, I.; LUNDGREN, G.; KARLÉN, B. Effects of Diazepam on muscarinic acetylcholine receptor binding in vivo and on oxotremorine-induced tremor and hypothermia in mice. **Pharmacol Toxicol**, v. 60, p. 61-258, 1987.

NOWAK, G.; TRULLAS, R.; LAYER, R. T.; SKOLNICK, P.; PAUL, I. A. Adaptive changes in the N-methyl-d-aspartate receptor complex after chronic treatment with imipramine and 1-aminocyclopropanecarboxylic acid. **J. Pharmac. exp. Ther**, v. 265, p. 1380-1386, 1993.

OKTEM, M.; EROGLU, D.; KARAHAN, H.B. Black cohosh and fluoxetine in the treatment of postmenopausal symptoms: A prospective, randomized trial. **Adv in Therapy**, v. 24, p. 448-461, 2007.

OLSON, R. GABA. In: DAVIS, K.; CHARNEY, D.; COYLE, J.; NEMEROFF, C.; editors. **Neuropsychopharmacology: The fifth generation of progress**. Philadelphia, 2002.

OSMERS, R.; FRIEDE, M.; LISKE, E. Efficacy and safety of isopropanolic black cohosh extract for climacteric symptoms. **Obstet Gynecol**, v. 105, p. 1074-1083, 2005.

OUCHI, K.; YAMAGISHI-WANG, H.; SAWAKI, K.; WATANABE, M.; KAWANO T.; KAWAGUCHI, M. Modulation of benzodiazepine receptor, adrenoceptor and muscarinic receptor by diazepam in rat parotid gland. **Eur J Pharmacol**, v. 657, p. 5-20, 2011.

OVERMIER, J. B. On the nature of animal of human behavioral dysfunction. In: HAUG, M.; WHALEN, R. E.; WASHINGTON, D. C. **Animal models of human emotion and cognition**: American Psychological Association, 1999. p. 15-24.

PALACIO, C.; MASRI, G.; MOORADIAN, A. D. Black cohosh for the management of menopausal symptoms: a systematic review of clinical trials. **Drugs Aging**, v. 26, p. 23-36, 2009.

PALMADA, M.; KINNE-SAFFRAN, E.; CENTELLES, J. J.; KINNE, R. K. Benzodiazepines differently modulate EAAT1/GLAST and EAAT2/GLT1 glutamate transporters expressed in CHO cells. **Neurochem Int**, v. 40, p. 6-321, 2002.

PARKINSON'S DISEASE FOUNDATION. **Parkinson Statistics**. Disponível em: <http://www.pdf.org/en/parkinson_statistics>. Acesso em: 20 dez. 2014a.

_____. **Disfuncion Gastrointestinal y Urina**. Disponível em: <http://www.pdf.org/en/fses_disfuncion_gastrointestinal_y_urina>. Acesso em: 24 dez. 2014b.

PARK, J.I.; BAE, H.R.; KIM, C. G.; STONIK, V. A.; KWAK, J.Y. Relationships between chemical structures and functions of triterpene glycosides isolated from sea cucumbers. **Frontiers in Chemistry**, v. 2, n. 77, 2014 doi:10.3389/fchem.2014.00077

PASCUAL-LEONE, A.; FREITAS, C.; OBERMAN, L.; HORVATH, J. C.; HALKO, M.; ELDAIEF, M.; BASHIR, S.; VERNET, M.; SHAFI, M.; WESTOVER, B.; VAHABZADEH-HAGH, A. M.; ROTENBERGM, A. Characterizing brain cortical plasticity and network dynamics across the age-span in health and disease with TMS-EEG and TMS-fMRI. **Brain Topography**, v. 24, p. 302-315. 2011.

PASQUINI, M.; BERARDELLI, I.; BIONDI, M. Etiopathogenesis of depressive disorders. **Clin Pract Epidemiol Ment Health**, v. 19, n. 10, p. 71-166, 2014.

PAUL, I. A.; LAYER, R. T.; SKOLNICK, P.; NOWAK, G. Adaptation of the NMDA receptor in rat cortex following chronic electroconvulsive shock or imipramine. **Eur. J. Pharmac**, v. 247, p. 305-311, 1993.

PAXINOS, G.; WATSON, C. The rat brain in stereotaxic coordinates. **New York: Academic Press**, 1986.

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. 67-149, 1985.

PELTO-HUIKKO, M.; DAGERLIND, A.; KONONEN, J.; LUNDBERG, J. M.; VILLAR, M.; KOISTINAHO, J.; BRAVO, R.; HÖKFELT, T. Neuronal regulation of c-fos, c-jun, and junB immediate-early genes in rat adrenal medulla. **J Neurosci**, v. 15, p. 68-1854, 1995.

PEREZ, F. A.; PALMITER, R. D. Parkin-deficient mice are not a robust model of parkinsonism. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, p. 2174-2179, 2005.

PERSSON, A.; SIM, S. C.; VIRIDING, S.; ONISHCHENKO, N.; SCHULTE, G.; INGELMAN-SUNDBERG, M. Decreased hippocampal volume and increased anxiety in a transgenic mouse model expressing the human CYP2C19 gene. **Mol Psychiatry**, v. 19, p. 41-733, 2014.

PETTERS, R. M.; SOMMER, J. R. Transgenic animals as models for human disease. **Transgenic Res**, v. 9, p. 347-351, 2000.

PHILLIPS, T. J.; BELKNAP, J. K.; HITZEMANN, R. J.; BUCK, K. J.; CUNNINGHAM, C. L.; CRABBE, J. C. Harnessing the mouse to unravel the genetics of human disease. **Genes Brain Behav**, v. 1, p. 14-28, 2002.

PISZCZATOWSKI, R. T.; RAFFERTY, B. J.; ROZADO, A.; TOBAK, S.; LENTS, N. H. The glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase gene (GAPDH) is regulated by myeloid zinc finger 1 (MZF-1) and is induced by calcitriol. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 451, p.137-141, 2014.

POLLACK, M. H.; JENSEN, J. E.; SIMON, N. M.; KAUFMAN, R. E.; RENSHAW P. F. High-field MRS study of GABA, glutamate and glutamine in social anxiety disorder: response to treatment with levetiracetam. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 32, p. 43-739, 2008.

POMPELLA, A.; VISVIKIS, A.; PAOLICCHI, A.; TATA, V.; CASINI, A. F. The changing faces of glutathione, a cellular protagonist. **Biochemical Pharmacology**, v. 66, p. 503-1499, 2003.

PORCHER, C.; HATCHETT, C.; LONGBOTTOM, R. E.; MCAINCH, K.; SIHRA, T. S.; MOSS, S. J.; THOMSON, A. M.; JOVANOVIĆ, J. N. Positive feedback regulation between gamma-aminobutyric acid type A (GABA(A)) receptor signaling and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) release in developing neurons. **J Biol Chem**, v. 286, p. 77-21667, 2011.

PORSOLT, R. D.; ANTON, G.; BLAVET, N.; JAFRE, M. Behavioral despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatments. **Eur. J. Pharmacol**, v. 47, p. 79-339, 1978.

PORSOLT, R. D.; BERTIN, A.; JALFRE, M. Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. **Archive of International Pharmacodynamics and Therapeutics**, v. 229, p. 327-336, 1977.

PRANSKI, E.; VAN SANFORD, C. D.; DALAL, N.; ORR, A. L.; KARMALI, D.; COOPER, D. S.; GEARING, M.; LAH, J. J.; LEVEY, A. I.; BETARBET, R. NF- κ B activity is inversely correlated to RNF11 expression in Parkinson's disease. **Neurosci Lett**, v. 547, p. 16-20, 2013.

QIU, S. X.; DAN, C.; DING, L. S.; PENG, S.; CHEN, S. N.; FARNSWORTH, N. R.; NOLTA, J.; GROSS, M. L.; ZHOU, P. A triterpene glycoside from black cohosh that inhibits osteoclastogenesis by modulating RANKL and TNF α signaling pathways. **Chem Biol**, v. 14, n.7, p.860-869, 2007.

RAMAR, S.; SARASWATHI, P. Histomorphometric Study of Fructus Psoralea on Ethanol Induced Neurodegeneration of Hippocampus in Rat. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v. 7, n. 8, p. 1561–1564, 2013.

RAMOS, L. A.; CAVALHEIRO, C., C., S., CAVALHEIRO, E., T., G. Determinação de nitrito em águas utilizando extrato de flores. **Quím. Nova**. v. 29, n.5, p. 1114-1120, 2006.

RAND, M. S. Selection of biomedical animal models. In: CONN, P. M.; TOTOWA, N. J. **Sourcebook of models for biomedical research**: Humana Press, 2008.

RAO, N. J.; SUBASH, K. R.; KUMAR, K. S. Role of Phytotherapy in Gingivitis: A Review. **International Journal of Pharmacology**, v. 8, p. 1-5, 2012.

REAGAN-SHAW, S.; NIHAL, M.; AHMAD, N. Dose translation from animal to human studies revisited. **FASEB J**, v.22, n. 3, p.659-661, 2008.

RÉUS, G. Z.; DOS SANTOS, M. A.; ABELAIRA, H. M.; RIBEIRO, K. F.; PETRONILHO, F.; VUOLO, F.; COLPO, G. D.; PFAFFENSELLER, B.; KAPCZINSKI, F.; DAL-PIZZOL, F.; QUEVEDO, J. Imipramine reverses alterations in cytokines and BDNF levels induced by maternal deprivation in adult rats. **Behav Brain Res**. v. 1, n. 242, p.40-46, 2013. doi: 10.1016/j.bbr.2012.11.044. Epub 2012 Dec 10.

RHYU, M.R.; LU, J.; WEBSTER D.E.; FABRICANT, D.S.; FARNSWORTH, N.R.; WANG, Z.J.; Black cohosh (*Actaea racemosa*, *Cimicifuga racemosa*) behaves as a mixed competitive ligand and partial agonist at the human mu opiate receptor. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 54, p. 9852-9857, 2006doi:10.1021/jf062808u.

RICHTER, L.; DE GRAAF, C.; SIEGHART, W.; VARAGIC, Z.; MÖRZINGER, M.; DE ESCH, I. J.; ECKER, G. F.; ERNST, M. Diazepam-bound GABAA receptor models identify new benzodiazepine binding-site ligands. **Nat Chem Biol**, v. 8, p. 64-455, 2012.

RIHMER, Z.; GONDA, X.; DÖME, P. Depression in Parkinson's disease. **Ideggyogy Sz.** v. 30, n. 67, p. 36-229, 2014.

RIVERA, C.; LI, H.; THOMAS-CRUSELLS, J.; LAHTINEN, H.; VIITANEN, T.; NANOBASHVILI, A.; KOKAIA, Z.; AIRAKSINEN, M. S.; VOIPIO, J.; KAILA, K.; SAARMA, M. BDNF-induced TrkB activation down-regulates the K⁺-Cl⁻ cotransporter KCC2 and impairs neuronal Cl⁻ extrusion. **J Cell Biol**, v. 159, p. 52-747, 2002.

ROCK, E.; DEMICHELE, A. Nutritional approaches to late toxicities of adjuvant chemotherapy in breast cancer survivors. **American Society for Nutritional Sciences**, p. 93-3785, 2003.

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

ROLLAND, A.; FLEURENTIN, J.; LANHERS, M. C.; YOUNOS, C.; MISSLIN, R.; MORTIER, F. Behavioural effects of the American traditional plant *Eschscholzia californica*: sedative and anxiolytic properties. **Planta Med**, v. 57, p. 6-212, 1991.

ROVER JUNIOR, L.; HOEHR, N.F.; VELLASCO, A.P.; KUBOTA, L. T. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutationa associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. **Quím. Nova**. V.24, n.1, p. 112-119, 2001.

ROZEN, S.; SKALETSKY, H. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. **Methods Mol Biol**, v. 132, p. 365-386, 2000.

RUHLEN, R. L.; SUN, G. Y.; SAUTER, E. R. Black Cohosh: Insights into its Mechanism(s) of Action. **Integr Med Insights**, v. 3, p. 21-32, 2008.

SAMMARTINO, A.; TOMMASELLI, G. A.; GARGANO, V.; DI CARLO, C.; ATTIANESE, W.; NAPPI, C. Short-term effects of a combination of isoflavones, lignans and *Cimicifuga racemosa* on climacteric-related symptoms in postmenopausal women: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. **Gynecol Endocrinol**, v. 22, p. 50-646, 2006.

SANKOVA, N. M.; BERTON, O.; RENTHAL, W.; KUMAR, A.; NEVE, R. L.; NESTLER, E. J. Sustained hippocampal chromatin regulation in a mouse model of depression and antidepressant action. **Nature Neuroscience**, v. 9, p. 25-519, 2006.

SARAF, M. K.; PRABHAKAR, S.; PANDHI, P.; ANAND, A. *Bacopa monniera* ameliorates amnesic effects of Diazepam qualifying behavioral-molecular partitioning. **Neuroscience**, v. 155, p. 476-484, 2008.

SARKER, S. D; NAHAR, L. **Química para estudantes de Farmácia**: Química Geral, Orgânica e de Produtos Naturais. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009.

SCALZO, P.; KÜMMER, A.; BRETAS, T. L.; CARDOSO, F.; TEIXEIRA, A. L. Serum levels of brain-derived neurotrophic factor correlate with motor impairment in Parkinson's disease. **J Neurol**, v. 257, p. 5-540, 2010.

SCHELLENBERG, R.; SALLER, R.; HESS, L.; MELZER, J.; ZIMMERMANN, C.; DREWE, J.; ZAHNER, C. Dose-Dependent Effects of the *Cimicifuga racemosa* Extract Ze 450 in the Treatment of Climacteric Complaints: A Randomized, Placebo-Controlled Study. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. eCAM**, 2012.

SCHINZEL, A. C.; TAKEUCHI, O.; HUANG, Z.; FISHER, J. K.; ZHOU, Z.; RUBENS, J.; HETZ, C.; DANIAL, N. N.; MOSKOWITZ, M. A.; KORSMEYER, S. J. Cyclophilin D is a component of mitochondrial permeability transition and mediates neuronal cell death after focal cerebral ischemia. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 102, p. 12005-12010, 2005.

SCHMID, D.; GRUBER, M.; WOEHS, F.; PRINZ, S.; ETZLSTORFER, B.; PRUCKER, C.; FUZZATI, N.; KOPP, B.; MOESLINGER, T. Inhibition of inducible nitric oxide synthesis by *Cimicifuga racemosa* (*Actaea racemosa*, black cohosh) extracts in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages. **J Pharm Pharmacol**, v. 61, p. 96-1089, 2009.

SCHOLZ, R. W.; GRAHAM, K. S.; GUMPRICHT, E.; REDDY, C. C. Mechanism of interaction of vitamin E and glutathione in the protection against membrane lipid peroxidation. *Ann NY Acad Sci* 1989;570:514-7. Hughes RE. Reduction of dehydroascorbic acid by animal tissues. **Nature**, v. 203, p. 9-1068, 1964.

SCHREIHOFFER, D. A. Phytoestrogens as neuroprotectants. **Drugs Today (Barc)**, v. 45, n. 8, p. 27-609, 2009.

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

SEKIYAMA, K.; SUGAMA, S.; FUJITA, M.; SEKIGAWA, A.; TAKAMATSU, Y.; WARAGAI, M.; TAKENOUCI, T.; HASHIMOTO, M. Neuroinflammation in Parkinson's Disease and Related Disorders: A Lesson from Genetically Manipulated Mouse Models of α -Synucleinopathies. **Parkinson's Disease**, 2012.

SEMBA, E.; MATSUNAGA, K.; TOHYAMA, M.; NOGUCHI, K. Stress-induced c-fos expression in the rat brain: activation mechanism of sympathetic pathway. **Brain Res Bull**, v. 31, p. 44-329, 1993.

SERAFIM, A. P.; FILICIO, L. F. Dopaminergic modulation of *grooming* behavior in virgin and pregnant rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 34, p. 1465-1470, 2001.

SETCHELL, K. D. R. Phytoestrogens: the biochemistry, physiology and implications for human health of soy isoflavones. **Am J Clin Nutr**, v. 68, p. 46-1333, 1998.

SHAO, Y.; HARRIS, A.; WANG, M.; ZHANG, H.; CORDELL, G. A.; BOWMAN, M.; LEMMO, E. Triterpene glycosides from *Cimicifuga racemosa*. **J Nat Prod**, v. 63, p. 10-905, 2000.

SHULTS, C. W.; KIMBER, T.; ALTAR, C. A. BDNF attenuates the effects of intrastriatal injection of 6-hydroxydopamine. **Neuroreport**, v. 6, p. 12-1109, 1995.

SIELGEL, P. S. A simple electronic device for the measurement of gross bodily activity of small animals. **J. Psychol**, v. 21, p. 227-236, 1946.

SILVA, A. G.; BRANDÃO, A. B.; CACCIARI, R. S.; SOARES, W. H. Avanços na elucidação dos mecanismos de ação de *Cimicifuga racemosa* (L.) Nutt. nos sintomas do climatério. **Rev. Bras. Pl. Med**, Botucatu, v.11, n. 4, p. 455-464, 2009.

SIMONATO, M.; BENNETT, J.; BOULIS, N. M.; CASTRO, M. G.; FINK, D. J.; GOINS, W. F.; GRAY, S. J.; LOWENSTEIN, P. R.; VANDENBERGHE, L. H.; WIDLÖCHER, D. J. Psychomotor retardation: clinical, theoretical and psychometric aspects. **Psychiatric Clinics of North América**, v. 6, p. 27-40, 1983.

SINGH, S.; AHMAD, R.; MATHUR, D.; SAGAR, R. K.; KRISHANA, B. Neuroprotective effect of BDNF in young and aged 6-OHDA treated rat model of Parkinson disease. **Indian J Exp Biol**, v. 44, p. 699-704, 2006.

SKEBERDIS, V. A.; LAN, J.; OPITZ, T.; ZHENG, X.; BENNETT, M. V.; ZUKIN R. S. mGluR1-mediated potentiation of NMDA receptors involves a rise in intracellular calcium and activation of protein kinase C. **Neuropharmacology**, v. 40, p. 65-856, 2001.

SMIAŁOWSKA, M.; SZEWCZYK, B.; BRAŃSKI, P.; WIEROŃSKA, J. M.; PAŁUCHA, A.; BAJKOWSKA, M.; PILC, A. Effect of chronic imipramine or electroconvulsive shock on the expression of mGluR1a and mGluR5a immunoreactivity in rat brain hippocampus. **Neuropharmacology**, v. 42, p. 23-1016, 2002.

SOLANKI, I.; PARIHAR, P.; MANSURI, M. L.; PARIHAR, M. S. Flavonoid-Based Therapies in the Early Management of Neurodegenerative Diseases. **Adv Nutr**, v. 6, p. 64-72, 2015.

SOUZA, F. C. F.; LEITE, C. P.; MELO, C. T.; ARAÚJO, F. L.; GUTIERREZ, S. J.; BARBOSA-FILHO, J. M.; FONTELES, M. M.; VASCONCELOS, S. M.; VIANA, G. S. B.

Evaluation of effects of N-(2-Hydroxybenzoyl) Tyramine (Riparin II) from *Aniba riparia* (Ness) Mez (Lauracea) in anxiety models in mice. **Biol. Pharm. Bull**, v. 30, n. 7, p. 1212-1216, 2007.

SPENCER, J. P. E. The interactions of flavonoids within neuronal signalling pathways. **Genes Nutr**, v. 2, p. 73-257, 2007.

STARR, M. S.; STARR, B. S. Behavioral synergism between the dopamine agonist SKF 38393 and LY 171555 dopamine-depleted mice. Antagonism by sulpirida reveals only stimulation psicosinaptic D2 receptores. **Pharmacol. Biochem. Behav**, v. 33, p. 41-44, 1989.

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

STUEHR, D.J. Mammalian nitric oxide synthases. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1411, p. 217-30, 1999. doi:10.1016/S0005-2728(99)00016-X.

STROMMER, B.; KHOM, S.; KASTENBERGER, I.; CICEK, S. S.; STUPPNER, H.; SCHWARZER, C.; HERING, S. A. Cycloartane Glycoside Derived from *Actaea racemosa* L. Modulates GABA Receptors and Induces Pronounced Sedation in Mice. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 351, p. 234-242, 2014.

SUBRAMANIAN, S. R.; CHESSELET, M. F. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in Parkinson's disease. **Progress in Neurobiology**, v. 127, p.1-16, 2013.

SULZER, D.; SURMEIER, D.J. Neuronal vulnerability, pathogenesis, and Parkinson's disease. **Movement Disorders**, v. 28, n. 1, 2013.

SURIYO, T.; THIANTANAWAT, A.; CHAIYAROJ, S. C.; PARKPIAN, P.; SATAYAVIVAD. J. Involvement of the lymphocytic muscarinic acetylcholine receptor in methylmercury-induced c-Fos expression and apoptosis in human leukemic T cells. **J Toxicol Environ Health A**, v. 71, p. 23-1109, 2008.

SUZUKI, S.; MIZUTANI, M.; SUZUKI, K.; YAMADA, M.; KOJIMA, M.; HATANAKA, H.; KOIZUMI, S. Brain-derived neurotrophic factor promotes interaction of the Nck2 adaptor protein with the TrkB tyrosine kinase receptor. **Biochem. Biophys. Res. Commun**, v. 294, p. 92-1087, 2002.

SWANSON, J.; ESTROFF, S.; SWARTZ, M. BORUM, R.; LACHICOTTE, W. ZIMMER, C.; WAGNER, R. Violence and severe mental disorder in clinical and community populations: the eddects of psychotic symptoms, comorbidity, and lack of treatment. **Psychiatry**, v. 60, p. 21-29, 1988.

TAKANO, K.; YAMASAKI, H.; KAWABE, K.; MORIYAMA, M.; NAKAMURA, Y. Imipramine induces brain-derived neurotrophic factor mRNA expression in cultured astrocytes. **J Pharmacol Sci**, V. 120, n. 3, p.176-186. 2012.

TANG, H.; ZANG, L.; DONG, Y.; KHAN, M.; YANG, F.; BRANN, D.W.; WANG, R. GPR 30 mediates estrogen rapid signaling and neuroprotection. **Mol Cell Endocrinol**, v. 25, p. 8-52, 2014.

TARZE, A.; DENIAUD, A.; LE BRAS, M.; MAILLIER, E.; MOLLE, D.; LAROCLETTE, N.; ZAMZAMI, N.; JAN, G.; KROEMER, G.; BRENNER, C. GAPDH, a novel regulator of the pro-apoptotic mitochondrial membrane permeabilization. **Oncogene**, v. 26, p. 20-2606, 2007.

TECOTT, L. H.; NESTLER, E. J. Neurobehavioral assessment in the information age. **Nature Neuroscience**, v. 7, p. 462-466, 2004.

TEPPER, J. M.; TECUAPETLA, F.; KOÓS, T.; IBÁÑEZ-SANDOVAL, O. Heterogeneity and diversity of striatal GABAergic interneurons. **Front Neuroanat**, 2010.

TOBÓN-VELASCO, J. C.; LIMÓN-PACHECO, J. H.; OROZCO-IBARRA, M.; MACÍAS-SILVA, M.; VÁZQUEZ-VICTORIO, G.; CUEVAS, E.; ALI, S. F.; CUADRADO, A.; PEDRAZA-CHAVERRÍ, J.; SANTAMARÍA, A. 6-OHDA-induced apoptosis and mitochondrial dysfunction are mediated by early modulation of intracellular signals and interaction of Nrf2 and NF- κ B factors. **Toxicology**, p. 19-109, 2013.

TOULOUSE, A.; SULLIVAN, A. M. Progress in Parkinson's disease-where do we stand. **Prog. Neurobiol**, v. 85, p. 376-392, 2008.

TUON, T.; VALVASSORI, S. S.; DAL PONT, G. C.; PAGANINI, C. S.; POZZI, B. G.; LUCIANO, T. F.; SOUZA, P. S.; QUEVEDO, J.; SOUZA, C. T.; PINHO, R. A. Physical training prevents depressive symptoms and a decrease in brain-derived neurotrophic factor in Parkinson's disease. **Brain Res Bull**, v. 108, p. 12-106, 2014.

UPADHYAY, A.; SINGH, D.K.. Pharmacological effects of *Sapindus mukorossi*. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo*, v. 54, n. 5, pp. 273-280, 2012. <http://dx.doi.org/10.1590/S0036-46652012000500007>.

USHIJIMI, I.; CARINO, M. A.; HORITA, A. Involvement of D1 and D2 dopamine system in the behavioral effects of cocaine in rats. **Pharmacol. Biochem. Behav**, v. 52, p. 737-741, 1995.

VALADAS, J. S.; VOS, M.; VERSTREKEN, P. Therapeutic strategies in Parkinson's disease: what we have learned from animal models. **Ann N Y Acad Sci**, 2014.

VATANPARAST, H.; CHILIBECK, P. D. Does the effect of soy phytoestrogens on bone in postmenopausal women depend on the equol-producing phenotype. **Nutr. Rev**, v. 65, p. 294-299, 2007.

VASA, R.A.; MAZUREK, M.O. An update on anxiety in youth with autism spectrum disorders. **Curr Opin Psychiatry**, 2015.

VENNA, V. R.; DEPLANQUE, D.; ALLET, C.; BELARBI, K.; HAMDANE, M.; BORDET, R. PUFA induce antidepressant-like effects in parallel to structural and molecular changes in the hippocampus. **Psychoneuroendocrinology**, v. 34, p. 199-211, 2009.

VERMES, G.; BÁNHIDY, F.; ACS, N. The effects of remifemin on subjective symptoms of menopause. **Advances in Therapy**, v. 22, n. 2, p. 54-148, 2005.

VIROK, D. P.; KIS, Z.; SZEGEDI, V.; JUHÁSZ, G.; ZVARA, A. J. R.; MÜLLER, G.; LÉVAY, G.; HÁRSING, L. G.; RAJKÓ, R.; PENKE, B.; JANKA, Z.; JANÁKY, T.; PUSKÁS, L. G. Functional changes in transcriptomes of the prefrontal cortex and hippocampus in a mouse model of anxiety. **Pharmacol Rep**, v. 63, p. 61-348, 2011.

VOYTEK.; BRADLEY.; KNIGHT.; ROBERT, T. Prefrontal cortex and basal ganglia contributions to working memory. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, p. 18167-18172, 2010.

WAHLSTEN, D.; RUSTAY, N. R.; METTEN, P.; CRABBE, J. C. In search of a better mouse test. **Trends Neurosci**, v. 26, p. 132-136, 2003.

WALF, A. A.; FRYE, C. A. The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. **Nature Protocols**, v. 2, p. 322-328, 2007.

WAMBEBE, C. Influence of some agents that affect 5-hydroxy-tryptamine metabolism and receptors on nitrazepam-induced sleep in mice. **Braz J Pharmacol**, v. 84, p. 91-185, 1985.

WANG, Y. H.; YU, H. T.; PU, X. P.; DU, G. H. Baicalein prevents 6-hydroxydopamine-induced mitochondrial dysfunction in SH-SY5Y cells via inhibition of mitochondrial oxidation and up-regulation of DJ-1 protein expression. **Molecules**, v. 18, p. 18-14726, 2013.

WANG, R.; ZHANG, M.; ZHOU, W.; LY, P. T.; CAI, F.; SONG, W. NF- κ B signaling inhibits ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L1 gene expression. **J Neurochem**, v. 116, p. 70-1160, 2011.

WANG, C.; JIE, C.; DAI, X. Possible roles of astrocytes in estrogen neuroprotection during cerebral ischemia. **Ver. Neurosci**, v. 25, p. 68-255, 2014.

WELCH, J. M.; LU, J.; RODRIGUIZ, R. M.; TROTTA, N. C.; DING, J. D.; FELICIANO, C.; CHEN, M.; ADAMS, J. P.; LUO, J.; DUDEK, S. M.; WEINBERG, R. J.; CALAKOS, N.; WETSEL, W. C.; FENG, G. Cortico-striatal synaptic defects and OCD-like behaviours in Sapap3-mutant mice. **Nature**, v. 448, n. 7156, p. 894-900, 2007.

WIINTER, Y.; BEZDOLNYY, Y.; KATUNINA, E. Incidence of Parkinson's disease and atypical parkinsonism: Russian population-based study. **Movement Disorders**, v. 25, n. 3, p. 349-356, 2010.

WILLIAMS, M. B.; JOPE, R. S. Distinctive rat brain immediate early gene responses to seizures induced by lithium plus pilocarpine. **Brain Res Mol Brain Res**, v. 25, p. 9-80, 1994.

WILLNER, P. Behavioral models in psychopharmacology. In: WILLNER, P. **Behavioral Models in Psychopharmacology: Theoretical, Industrial and Clinical Perspectives**. Cambridge, UK: Cambridge Univ. Press, 1991. p. 3-18.

WILKINSON, M. B.; XIAO, G.; KUMAR, A.; LAPLANT, Q.; RENTHAL, W.; SIKDER, D.; KODADEK, T. J.; NESTLER, E. J. Imipramine treatment and resiliency exhibit similar chromatin regulation in the mouse nucleus accumbens in depression models. **J Neurosci**, v. 29, p. 32-7820, 2009.

WINGE, K.; SKAU, A. M.; STIMPEL, H.; NIELSEN, K. K.; WERDELIN, L.; Prevalence of bladder dysfunction in Parkinson's disease. **Neurorol and Urodyn**, v. 25, p. 22-116, 2006.

WINTERHOFF, H.; SPENGLER, B.; CHRISTOFFEL, V.; BUTTERWECK, V.; LO'HNING, A. Cimicifuga extract BNO 1055: reduction of hot flushes and hints on antidepressant activity. **Maturitas**, v. 44, p. 51-58, 2003.

WORLD HEALTH ORGANIZATION-WHO. Rhizoma cimicifugae racemosae. In: **WHO monographs on selected medicinal plants**. Geneve: WHO, 2002. v. 2, p. 55-65.

WUTTKE, W.; JARRY, H.; HAUNSCHILD, J.; STECHER, G.; SCHUH, M.; SEIDLOVA-WUTTKE, D. The non-estrogenic alternative for the treatment of climacteric complaints: Black cohosh (Cimicifuga or Actaea racemosa). **J Steroid Biochem Mol Biol**, v. 139, p. 302-310, 2014.

_____. The *Cimicifuga* preparation BNO 1055 vs. conjugated estrogens in a double-blind placebo-controlled study: effects on menopause symptoms and bone markers. **Maturitas**, v. 44, p. 67-77, 2003.

XIE, Y. X.; BEZARD, E.; ZHAO, B. L. Investigating the receptor-independent neuroprotective mechanisms of nicotine in mitochondria. **J Biol Chem**, v. 280, p. 12-32405, 2005.

XU, M.; DENG, P. X.; QI, C.; DENG, B.; ZHAO, Z. Z.; WONG, V.; NGAN, T.; KAN, V.; TIAN, X. Y.; XU, D. Y.; AU, D. Adjuvant phytotherapy in the treatment of cervical cancer: a systematic review and meta-analysis. **Journal of Alternative and Complementary Medicine**, v. 15, p. 1347-1353, 2009.

YU, O.; JEZ, J. M. Nature's assembly line: biosynthesis of simple phenylpropanoids and polyketides. **The Plant Journal**, v. 54, p. 750-762, 2008.

YUNES, R. A.; FILHO, V. C. Breve Análise Histórica da Química de Plantas Medicinais: Sua importância na Atual Conceção de Fármaco segundo os Paradigmas Ocidental e Oriental. In: YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. **Plantas Medicinais sob a ótica da Química Medicinal Moderna**. Chapecó: Argos, 2001, p. 17-44.

ZASLER, N. D.; MARTELLI, M. F.; JACOBS, H. E. Neurobehavioral disorders. **Handb. Clin. Neurol**, v. 110, p. 377-388, 2013.

ZHANG, R.; WANG, Z.; HOWSON, P. A.; XIA, Z.; ZHOU, S.; WU, E.; XIA, Z.; HU, Y. Smilagenin attenuates beta amyloid (25-35)-induced degeneration of neuronal cells via stimulating the gene expression of brain-derived neurotrophic factor. **Neuroscience**, p.1-11, 2012.

ZHANG, L.; DAWSON, V. L.; DAWSON, T. M. Role of nitric oxide in Parkinson's disease. **Pharmacol Therapeutics**, v. 109, p. 33-41, 2006.

ZOROV, D. B.; FILBURN, C. R.; KLOTZ, L. O.; ZWEIER, J. L.; SOLLITT, S. J. Reactive oxygen species (ROS)-induced ROS release: a new phenomenon accompanying induction of the mitochondrial permeability transition in cardiac myocytes. **J. Exp. Med**, v. 192, p. 1001-1014, 2000.