



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**FACULDADE DE MEDICINA**  
**DEPARTAMENTO DE CIRURGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM CIÊNCIAS MÉDICO-  
CIRÚRGICAS**

**ANDREA DE OLIVEIRA ALBUQUERQUE**

**REDUÇÃO DA REAÇÃO OXIDATIVA SISTÊMICA E HEPÁTICA OCACIONADA  
POR ESTRESSE CRÔNICO MODERADO IMPREVISÍVEL EM RATOS  
TRATADOS COM ELETROACUPUNTURA E TRANS-ANETOL**

**FORTALEZA**

**2020**

ANDREA DE OLIVEIRA ALBUQUERQUE

REDUÇÃO DA REAÇÃO OXIDATIVA SISTÊMICA E HEPÁTICA OCACIONADA  
POR ESTRESSE CRÔNICO MODERADO IMPREVISÍVEL EM RATOS TRATADOS  
COM ELETROACUPUNTURA E TRANS-ANETOL

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Médico-cirúrgicas do Departamento de Cirurgia da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Doutor (a) em Ciências médico-cirúrgicas. Área de concentração: Efeitos da Acupuntura e Eletroacupuntura Sobre o Metabolismo Energético, Estresse Oxidativo e a Inflamação em Animais.

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Botelho Guimaraes

Coorientador: Prof. Dr. Edson Lopes da Ponte

**FORTALEZA**

**2020**

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

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

---

A298r Albuquerque, Andréa.  
REDUÇÃO DA REAÇÃO OXIDATIVA SISTÊMICA E HEPÁTICA OCACIONADA  
POR ESTRESSE CRÔNICO MODERADO IMPREVISÍVEL EM RATOS TRATADOS  
COM ELETROACUPUNTURA E TRANS-ANETOL / Andréa Albuquerque. – 2020.  
116 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de  
Pós-Graduação em Ciências Médico-Cirúrgicas, Fortaleza, 2020.

Orientação: Prof. Dr. Sérgio Botelho Guimarães.

Coorientação: Prof. Dr. Edson Lopes da Ponte.

1. Trans-anetol. 2. Eletroacupuntura. 3. Inflamação. 4. Estresse oxidativo. 5. Estresse  
Crônico Moderado Imprevisível.

---

CDD 617

ANDREA DE OLIVEIRA ALBUQUERQUE

REDUÇÃO DA REAÇÃO OXIDATIVA SISTÊMICA E HEPÁTICA OCACIONADA  
POR ESTRESSE CRÔNICO MODERADO IMPREVISÍVEL EM RATOS TRATADOS  
COM ELETROACUPUNTURA E TRANS-ANETOL

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Médico-cirúrgicas do Departamento de Cirurgia da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Doutor (a) em Ciências médico-cirúrgicas. Área de concentração: Efeitos da Acupuntura e Eletroacupuntura Sobre o Metabolismo Energético, Estresse Oxidativo e a Inflamação em Animais.

Aprovada em: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Dr. Sérgio Botelho Guimarães  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. Edson Lopes da Ponte  
Centro Universitário Christus (UNICHRISTUS)

---

Prof. Dra Meyssa Quezado de Figueiredo Cavalcante Casadevall  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. José Lima de Carvalho Rocha  
Centro Universitário Christus (UNICHRISTUS)

---

Prof. Dr. José Eduardo Ribeiro Honório Júnior  
Centro Universitário Christus (UNICHRISTUS)

## AGRADECIMENTOS

A Deus pela saúde física e mental, pelo amor de pessoas queridas, pelas oportunidades concedidas, e pelos sonhos realizados, os quais não seriam viáveis se não por meio da fé.

Ao CNPq pela confiança e apoio financeiro em prol da ciência com a manutenção da bolsa de auxílio que tornou possível a realização desta pesquisa.

Ao programa de Pós-graduação em Ciências Médico-cirúrgicas da Universidade Federal do Ceará (UFC), em especial aos coordenadores Prof. Dr. Paulo Roberto Leitão e Prof. Dr. Lusmar Veras Rodrigues (*in memoriam*), aos docentes envolvidos direta e indiretamente nessa pesquisa, Prof. Dr. Sérgio Botelho Guimarães e Prof. Dra. Maria Luzete Costa Cavalcante e demais professores do programa, as secretárias Magda Gomes Fontinele e Maria Luciene Vieira de Oliveira, pelo carinho e dedicação impar que dispõem ao Programa de Pós-graduação em Ciências Médico-cirúrgica, fazendo deste um programa de excelência. Pelo apoio a esta pesquisa e em toda trajetória acadêmica.

Ao Centro Universitário Christus (UNICHRISTUS), em especial ao Magnífico Reitor Prof. Dr. José Lima de Carvalho Rocha, ao docente Prof. Dr. Edson Lopes da Ponte e a secretária Vânia Maria Santana Costa, pela oportunidade de realização de dois sonhos, a medicina e o doutorado, dentro de um centro universitário de referência, com investimento em pesquisa por meio do Programa de Iniciação Científica, possibilitando a factibilidade desses projetos e outras pesquisas.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Sérgio Botelho Guimarães, pelo incentivo a pesquisa desde a graduação na UFC. Pela confiança e temperança quanto a este trabalho e minha nova condição acadêmica. Pela disponibilidade de materiais. Pelo tempo e conhecimento dispendidos ao meu crescimento profissional.

Ao meu coorientador, Prof. Dr. Edson Lopes da Ponte, por ter abraçado esse projeto com tanto carinho e entusiasmos, tornando possível a minha dupla jornada como aluna de medicina e pesquisadora. Pela confiança no meu desempenho, pelas palavras de incentivo, pelos materiais, pela dedicação em todo processo desse estudo e pelos ensinamentos que vão além desse trabalho.

Aos alunos do Programa Iniciação Científica do Centro Universitário Christus (UNICHRISTUS) Lucas Ribeiro Mesquita, Francisco Emanuel Albuquerque de Souza Júnior e Maria Edith Holanda Banhos, pela dedicação, empenho e compromisso que

proporcionou exequibilidade e leveza para realização desse projeto. E, também, pela amizade que transpôs o ambiente de pesquisa.

A todos os profissionais responsáveis pelo Biotério e pelos Laboratórios didáticos e científicos da UNICHRISTUS sede Parque Ecológico e aos técnicos de laboratório do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos da UFC pela paciência, disponibilidade e apoio ao longo de todo processo.

Aos Professores Doutores participantes das Banca Examinadora desse trabalho, pela disponibilidade, pelo tempo despendido na leitura do trabalho e pelas valiosas discussões levantadas e sugestões para melhoria do mesmo.

A minha mãe, Maria Luciene Vieira de Oliveira, cuja caminhada e batalha diária para nos dedicar o melhor de si, possibilitou condições de uma vida confortável, cercada de amor e educação. Pela sua dedicação e sonho conjunto.

Ao meu pai, Francisco Das Chagas Dias de Albuquerque, pelos ensinamentos pautados no respeito, humildade e educação. Por todas as palavras confortantes sobre meu nervosismo. Pelo seu amor pleno e sereno.

A minha irmã, Aline de Oliveira Albuquerque, por estar presente em muitas etapas dos bastidores dessa pesquisa e da minha vida. Por seus conselhos e sua disponibilidade pessoal e acadêmica.

A minha tia Maria Auxiliadora Dias de Albuquerque, por sua dedicação inexplicável a minha criação. Por protagonizar um espaço especial na caminhada do meu sucesso pessoal e profissional, sendo solícita e amorosa em todos os detalhes.

Aos meus avós e tios paternos e maternos, em especial minha avó Maria de Lourdes Dias de Albuquerque, as minhas tias Paula Franscinete Dias de Albuquerque e Maria Conceição Dias Albuquerque, por proporcionar condições para almejar oportunidades únicas na vida pessoal e profissional.

Ao meu namorado, Abel Brasil Ramos da Silva, pela disponibilidade técnica na compreensão dos dados estatísticos, pelo ensino, paciência, e, principalmente, pelo apoio emocional constante e compreensão nas ausências.

Aos amigos, em especial a Suellen Fernandes dos Santos e Anavanessa Felipe Oliveira, pela disponibilização de materiais e conhecimento, pela compreensão nas ausências e motivação constante, pelos momentos de alegria e confissões.

Aos colegas da faculdade de medicina, pelo amparo acadêmico, pela torcida, companheirismo e apoio emocional diário.

## RESUMO

**Redução da reação oxidativa sistêmica e hepática ocasionada por estresse crônico moderado imprevisível em ratos tratados com Eletroacupuntura e Trans-anetol.** Andrea de Oliveira Albuquerque. Tese de Doutorado. Programa de pós-graduação *stricto sensu* em Ciências Médico-cirúrgicas. Departamento de Cirurgia. Faculdade de Medicina. Universidade Federal do Ceará. Orientador: Prof. Dr. Sérgio Botelho Guimarães; Coorientador: Prof. Dr. Edson Lopes da Ponte

A exposição prolongada ao estresse é um dos principais fatores que têm sido associados com a progressão de processos patológicos relacionado às vias oxidativas associadas a depressão. Fundamentado na demonstração de que o Trans-anetol e a Eletroacupuntura isoladamente apresentam efeitos moduladores na produção de enzimas antioxidativas e redução de fatores inflamatórios, este estudo visa avaliar o efeito da eletroacupuntura (100Hz) e do Trans-anetol como adjuvante no estresse oxidativo induzido por estresse crônico moderado imprevisível (ECMI) a partir de parâmetros hematológicos e hepáticos. Tratou-se de um estudo prospectivo, controlado e comparativo utilizando 42 ratos saudáveis, machos (*Rattus norvegicus*: var. *albinus*, *Rodentia*, *Mammalia*), aprovados pelo comitê de ética para uso de animais da Comitê de Ética e Pesquisa (CEPA), do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará (UFC) para uso de animais experimentais sob o nº 21/2016. Os animais foram submetidos ECMI durante seis (6) semanas, para o desenvolvimento de um quadro similar a depressão, constatado por Teste de Preferência a Sacarose, seguido por tratamento em 12 dias com Salina (G1), Eletroacupuntura 100 Hz nos acupontos VB34, E36 e R3 por 15 minutos em dias alternados (G2), Trans-anetol 1,0 mg/kg/dia por gavagem diariamente (G3) e Terapia combinada com Eletroacupuntura 100 Hz e Trans-anetol (G4). Foram coletadas amostras de sangue e de fígado para análise bioquímica de Transaminase glutâmico-oxalacética (TGO) e Transaminase glutâmico pirúvica (TGP) sérico, mieloperoxidase hepática (MPO) sérico e hepático, TBARS sérico e hepático, glutatona reduzida (GSH) sérica e hepática. Os animais apresentaram anedonia confirmada pelo Teste de Preferência a Sacarose com redução significativa de 60% ( $37,75 \pm 4,77$ ) preferência à sacarose. O ECMI promoveu ainda impacto de 39,6% sobre o ganho de peso, já o tratamento promoveu aumento médio de 19,2%. Quanto aos parâmetros bioquímicos foi evidenciado redução de TGO e TGP apenas com a terapia conjunta (G4) de 32,46% ( $53,27 \pm 7,73$ ) e 14,37% ( $45,09 \pm 4,09$ ), respectivamente, sem significância. A MPO reduziu significativamente G2- 39,87% ( $4,87 \pm 0,79$ ), G3 - 60,0% ( $3,25 \pm 0,74$ ) e G4 - 78,76% ( $1,72 \pm 0,50$ ); assim como TBARS no plasma também reduziu G2- 39,13% ( $0,14 \pm 0,04$ ), G3 - 60,86% ( $0,09 \pm 0,02$ ) e G4- 91,30% ( $0,02 \pm 0,01$ ) acompanhada também pela redução no fígado G2 - 46,51% ( $0,24 \pm 0,04$ ), G3- 55,81% ( $0,19 \pm 0,03$ ) e G4 - 74,41% ( $0,12 \pm 0,02$ ); a glutatona sérica, por sua vez, teve acréscimo de G2- 59,33% ( $105,94 \pm 3,25$ ), G3 - 121,92% ( $140,39 \pm 4,89$ ) e G4- 228,09% ( $216,32 \pm 4,73$ ) assim como no fígado G2- 21,67% ( $105,06 \pm 3,25$ ), G3 - 40,05% ( $140,39 \pm 4,89$ ) e G4 - 90,04% ( $216,32 \pm 4,73$ ). Conclui-se, então, que o tratamento com eletroacupuntura (100Hz) e/ou anetol em animais submetidos a ECMI promove proteção local e sistêmica sobre o estresse oxidativo, além de reduzir o estado inflamatório geral. Além disso, o tratamento conjunto apresenta efeito potencializador ao tratamento isolado, sendo a terapia combinada mais promissora como possibilidade terapêutica na depressão.

**Palavras-chave:** Trans-anetol. Eletroacupuntura. Inflamação. Estresse oxidativo. Estresse Crônico Moderado Imprevisível;

## ABSTRACT

### **Reduction of the systemic and hepatic oxidative reaction occasioned by chronic unpredictable mild stress in rats treated with electroacupuncture and trans-anethole.**

Andrea de Oliveira Albuquerque. PhD thesis. Pós-graduation Program *stricto sensu* in Medical-Surgical Sciences. Surgery Department. Medical school. Federal University of Ceará. Professors: Prof. Dr. Sérgio Botelho Guimarães; Prof. Dr. Edson Lopes da Ponte

Prolonged exposure to stress is one of the main factors that have been associated with the progression of pathological processes related to oxidative pathways that lead to depression. Based on the demonstration that trans-anethole and electroacupuncture alone have modulating effects on the production of anti-oxidative enzymes and reduction of inflammatory factors, this study aims to evaluate the effect of electroacupuncture (100Hz) and trans-anethole as adjuvant on oxidative stress induced by chronic unpredictable mild stress (CUMS) from hematological and hepatic parameters. This was a prospective, controlled and comparative study using 42 healthy male rats (*Rattus norvegicus*: var. *albinus*, Rodentia, Mammalia), approved by the Animal Ethics Committee of the Ethics and Research Committee (CEPA), from the Department of Physiology and Pharmacology of the Federal University of Ceará (UFC) for the use of experimental animals under No. 21/2016. The animals were subjected to CUMS for six (6) weeks, for the development of depression-like condition, verified by the Sucrose Preference Test, followed by 12-day treatment with Saline (G1), 100 Hz Electroacupuncture on VB34, E36 and R3 for 15 minutes on alternate days (G2), Trans-Anethole 1.0 mg / kg / day by gavage daily (G3) and Combination therapy with 100 Hz electroacupuncture and trans-anethole (G4). Blood and liver samples were collected for biochemical analysis of serum glutamic oxaloacetic transaminase (GOT) and glutamic pyruvic transaminase (GPT), hepatic serum and hepatic myeloperoxidase (MPO), serum and hepatic TBARS, reduced serum and hepatic glutathione (GSH). The animals presented anhedonia confirmed by the Sucrose Preference Test with a significant reduction of 60% ( $37,75 \pm 4,77$ ) in preference to sucrose. CUMS impacted weight gain by 39,6%, and treatment promoted an average increase of 19,2%. As for the biochemical parameters, there is a reduction in GOT and GPT only with the joint therapy of 32.46% ( $53.27 \pm 7.73$ ) and 14.37% ( $45.09 \pm 4.09$ ), respectively, without significance. There was a significant reduction on MPO by G2- 39,87% ( $4,87 \pm 0,79$ ), G3 - 60,0% ( $3,25 \pm 0,74$ ) and G4 - 78,76% ( $1,72 \pm 0,50$ ), as well as on plasm TBARS by reduziu G2- 39,13% ( $0,14 \pm 0,04$ ), G3 - 60,86% ( $0,09 \pm 0,02$ ) and G4- 91,30% ( $0,02 \pm 0,01$ ), accompanied by reduction in liver TBARS by G2 - 46,51% ( $0,24 \pm 0,04$ ), G3- 55,81% ( $0,19 \pm 0,03$ ) and G4 - 74,41% ( $0,12 \pm 0,02$ ). On the other hand, glutathione seric increased by G2- 59,33% ( $105,94 \pm 3,25$ ), G3 - 121,92% ( $140,39 \pm 4,89$ ) and G4- 228,09% ( $216,32 \pm 4,73$ ) like liver increase of this substance by G2- 21,67% ( $105,06 \pm 3,25$ ), G3 - 40,05% ( $140,39 \pm 4,89$ ) and G4 -90,04% ( $216,32 \pm 4,73$ ). It is concluded that the treatment with electroacupuncture (100Hz) and / or anethole in animals submitted a CUMS promotes local and systemic protection against oxidative stress, besides reducing the general inflammatory state. In addition, combination therapy had a cumulative effect showing a potentiating effect when compare to individual treatments, being a promising alternative as a therapeutic intervention in depression.

**Keywords:** Trans- anethole. Electroacupuncture. Inflammation. Oxidative stress. Chronic Unpredictable Mild Stress.

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Descrição dos estressores aplicado no protocolo de ECMI.....	53
Tabela 2 -	Variação percentual do peso médio dos ratos nos períodos pré-estressor, estressor, pré-tratamento e pós-tratamento de acordo com os grupos.....	61
Tabela 3 -	Análise do Teste de Preferência à Sacarose (TPS) em ratos.....	61
Tabela 4 -	Efeitos da Eletroacupuntura (100 Hz) e/ou do Trans-anetol em ratos submetidos a Estresse Crônico Moderado Imprevisível (ECMI) sobre as concentrações de TGO plasmáticos.....	62
Tabela 5 -	Efeitos da Eletroacupuntura (100 Hz) e/ou do Trans-anetol em ratos submetidos a Estresse Crônico Moderado Imprevisível (ECMI) sobre as concentrações de TGP plasmáticos.....	63
Tabela 6 -	Efeitos da Eletroacupuntura (100 Hz) e/ou do Trans-anetol em ratos submetidos a Estresse Crônico Moderado Imprevisível (ECMI) sobre as concentrações de MPO no hepático.....	65
Tabela 7 -	Efeitos da Eletroacupuntura (100 Hz) e/ou do Trans-anetol em ratos submetidos a Estresse Crônico Moderado Imprevisível (ECMI) sobre as concentrações de TBARs plasmático.....	66
Tabela 8 -	Efeitos da Eletroacupuntura (100 Hz) e/ou do Trans-anetol em ratos submetidos a Estresse Crônico Moderado Imprevisível (ECMI) sobre as concentrações de TBARs hepático .....	67
Tabela 9 -	Efeitos da Eletroacupuntura (100 Hz) e/ou do Trans-anetol em ratos submetidos a Estresse Crônico Moderado Imprevisível (ECMI) sobre as concentrações de glutathiona plasmática.....	69
Tabela 10 -	Efeitos da Eletroacupuntura (100 Hz) e/ou do Trans-anetol em ratos submetidos a Estresse Crônico Moderado Imprevisível (ECMI) sobre as concentrações de glutathiona hepática.....	70
Tabela 11 -	Resumo esquemático dos principais efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes da Eletroacupuntura 100Hz e/ou Trans-anetol que apresentaram significância estatística .....	72

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Mecanismos fisiopatológicos do transtorno depressivo.....	19
Figura 2 - Delineamento do experimento.....	51
Figura 3 - Identificação dos grupos de animais submetidos ao tratamento pós-estresse crônico moderado e imprevisível (ECMI).....	52
Figura 4 - Rato posicionado na rede, para aclimação (preparação para as sessões de Eletroacupuntura) .....	54
Figura 5 - Rato posicionado na rede com agulhas inseridas nos pontos de realização da eletroacupuntura (Esquerda) e Eletrodos conectado a ponto VB34 e E36 (Direita).....	55
Figura 6 - Análise do Teste de Preferência à Sacarose (TPS) em ratos.....	61
Figura 7 - Efeitos da Eletroacupuntura (100 Hz) e/ou do Trans-anetol em ratos submetidos a Estresse Crônico Moderado Imprevisível (ECMI) sobre as concentrações de TGO plasmáticos.....	63
Figura 8 - Efeitos da Eletroacupuntura (100 Hz) e/ou do Trans-anetol em ratos submetidos a Estresse Crônico Moderado Imprevisível (ECMI) sobre as concentrações de TGP plasmáticos.....	64
Figura 9 - Efeitos da Eletroacupuntura (100 Hz) e/ou do Trans-anetol em ratos submetidos a Estresse Crônico Moderado Imprevisível (ECMI) sobre as concentrações de MPO no hepático.....	65
Figura 10 Efeitos da Eletroacupuntura (100 Hz) e/ou do Trans-anetol em ratos submetidos a Estresse Crônico Moderado Imprevisível (ECMI) sobre as concentrações de TBARs plasmático.....	67
Figura 11 Efeitos da Eletroacupuntura (100 Hz) e/ou do Trans-anetol em ratos submetidos a Estresse Crônico Moderado Imprevisível (ECMI) sobre as concentrações de TBARs hepático .....	68
Figura 12 Efeitos da Eletroacupuntura (100 Hz) e/ou do Trans-anetol em ratos submetidos a Estresse Crônico Moderado Imprevisível (ECMI) sobre as concentrações de glutaciona plasmática.....	70
Figura 13 Efeitos da Eletroacupuntura (100 Hz) e/ou do Trans-aneto em ratos submetidos a Estresse Crônico Moderado Imprevisível (ECMI) sobre as concentrações de glutaciona hepática.....	71

Figura 14	Resumo esquemático das possíveis vias de inflamação e oxidação sistêmica e neural induzida pelo estresse crônico elucidadas pela literatura associado aos efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes da Eletroacupuntura 100Hz e Trans-anetol encontrados nessa pesquisa .....	78
-----------	--	----

**LISTA DE ABREVIATURAS**

ACTH	Hormônio adrenocorticotrófico
a.C.	Antes de cristo
ALT	Alanino aminotransferase
AST	Aspartato aminotranferase
ATP	Trifosfato de adenosina
BDNF	Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro
CRH	Hormônio liberador de corticotrofina
CAT	Catalase
CEPA	Comitê de Ética e Pesquisa Animal
5-HT	Serotonina
COMT	Catecol O-Metiltransferase
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DDE	Trans-2,4-decadial
E36	Estômago 36
EAc	Eletoacupuntura
ECMI	Estresse Crônico Moderado Imprevisível
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ERNs	Espécie Reativa de Nitrogênio
EROs	Espécie Reativa de Oxigênio
ERGS	Resposta a glicocorticoides
GSH	Glutationa Reduzida
GR	Glutationa redutase
GPx	Glutationa Peroxidase
GSSG	Glutationa Oxidada
HPA	Hipófise-Pituitária-Adrenal
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogênio
HOCl	Ácido Hipocloroso
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	Ácido fosfórico
Hz	Hertz
IFN	Interferon
IL	Interleucina
ISRS	Inibidor seletivo da recaptção de serotonina

LOOH	Hidroperóxidos de lipídio
LPO	Peroxidação lipídica ou lipoperoxidação
MAO	Monoamina oxidase
MDA	Dialdeído malônico
ml	mililitros
MTC	Medicina Tradicional Chinesa
MPO	Mieloperoxidase
NADH	Dicotinamida Adenina Dinucleotídeo
NaCl	Cloreto de Sódio
NFkB	Fator de transcrição nuclear kappa B
NMDA	N-metil D-aspartato
NO	Óxido nítrico
OMS	Organização Mundial de Saúde
O <sub>2</sub>	Oxigênio
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Superóxido
RG	Receptor glicocorticoide
RL	Radicais livres
RM	Receptor mineralocorticoides
r.p.m	Rotação por minuto
SNA	Sistema Nervoso Autônomo
SNC	Sistema Nervoso Central
SNP	Sistema Nervoso Periférico
SOD	Superóxido Dismutase
SP	Substância P
SUS	Sistema Único de Saúde
TNF- $\alpha$	Fator de Necrose tumoral alfa
TGF- $\beta$	Fator de Transformação do crescimento beta
TPS	Teste de preferência a Sacarose
TBARS	Ácido tiobarbitúrico
TGP	Transaminase glutâmico pirúvico
TGO	Transaminase glutâmico oxalacético
VB34	Vesícula Biliar 34
WHO	World Health Organization

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>17</b>
<b>1.1</b>	<b>Depressão: panorama e características epidemiológicas.....</b>	<b>17</b>
<b>1.2</b>	<b>Fisiopatologia da depressão.....</b>	<b>18</b>
<b>1.2.1</b>	<i>Deficiência de monoaminas.....</i>	<i>19</i>
<b>1.2.2</b>	<i>Predisposição genética e interferência de fatores ambientais.....</i>	<i>19</i>
<b>1.2.3</b>	<i>Alterações no fator neurotrófico e seus receptores.....</i>	<i>20</i>
<b>1.2.4</b>	<i>Desregulação da via do óxido nítrico.....</i>	<i>20</i>
<b>1.2.5</b>	<i>Neuroinflamação e estresse oxidativo.....</i>	<i>21</i>
<b>1.2.6</b>	<i>Desregulação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal.....</i>	<i>21</i>
<b>1.3</b>	<b>Relação depressão e estresse.....</b>	<b>21</b>
<b>1.3.1</b>	<i>Estresse: estado pró-inflamatório sistêmico e seus impactos no Sistema Nervoso Central.....</i>	<i>22</i>
<b>1.3.1.1</b>	<i>Sistema Nervoso Autônomo.....</i>	<i>22</i>
<b>1.3.1.2</b>	<i>Eixo Hipófise-Pituitária-Adrenal e produção de glicocorticoides.....</i>	<i>23</i>
<b>1.3.1.3</b>	<i>Imunologia e produção de citocinas.....</i>	<i>26</i>
<b>1.3.1.4</b>	<i>Estresse Oxidativo e Mecanismo antioxidantes .....</i>	<i>30</i>
<b>1.3.2</b>	<i>Estresse como um fenômeno sistêmico: uma relação entre inflamação, estresse oxidativo hepático e depressão .....</i>	<i>34</i>
<b>1.3.3</b>	<i>Estresse experimental no desenvolvimento da depressão .....</i>	<i>36</i>
<b>1.3.3.1</b>	<i>Protocolo de Estresse Crônico Moderado e Imprevisível (ECMI) .....</i>	<i>36</i>
<b>1.3.3.2</b>	<i>Teste comportamental.....</i>	<i>37</i>
<b>1.4</b>	<b>Possibilidades Terapêuticas .....</b>	<b>38</b>
<b>1.4.1</b>	<b>Eletroacupuntura.....</b>	<b>38</b>
<b>1.4.1.1</b>	<i>Medicina Tradicional Chinesa (MTC): História da Acupuntura.....</i>	<i>38</i>
<b>1.4.1.2</b>	<i>Relação Fígado-Depressão.....</i>	<i>39</i>
<b>1.4.1.3</b>	<i>Acupontos.....</i>	<i>40</i>
<b>1.4.1.4</b>	<i>Neurofisiologia da acupuntura .....</i>	<i>41</i>
<b>1.4.1.5</b>	<i>Características e aplicações da Eletroacupuntura.....</i>	<i>44</i>
<b>1.4.2</b>	<b>Trans-Anetol.....</b>	<b>45</b>
<b>1.4.2.1</b>	<i>Importância da pesquisa com produtos naturais.....</i>	<i>45</i>
<b>1.4.2.2</b>	<i>Características gerais e propriedades biológicas do anetol.....</i>	<i>46</i>

1.4.2.3	<i>Atividade anti-inflamatória do Trans-anetol</i> .....	47
1.4.2.4	<i>Atividade do Trans-anetol na resposta ao estresse e a depressão</i> .....	47
1.5	<b>Relevância e justificativa</b> .....	48
2	<b>OBJETIVO</b> .....	49
2.1	<b>Objetivo Geral</b> .....	49
2.2	<b>Objetivos Específicos</b> .....	48
3	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	50
3.1	<b>Animais</b> .....	50
3.2	<b>Drogas e reagentes</b> .....	50
3.3	<b>Delineamento experimental</b> .....	51
3.4	<b>Distribuição da amostra</b> .....	51
3.5	<b>Estresse Crônico Moderado e Imprevisível</b> .....	51
3.6	<b>Teste de Preferência a Sacarose</b> .....	53
3.7	<b>Eletroacupuntura</b> .....	54
3.7.1	<i>Condicionamento dos ratos</i> .....	54
3.7.2	<i>Localização dos pontos e protocolo de aplicação da Eletroacupuntura</i>	54
3.8	<b>Administração de Trans-anetol</b> .....	56
3.9	<b>Coleta amostra e avaliação bioquímica</b> .....	56
3.9.1	<i>Procedimento anestésico para coleta</i> .....	56
3.9.2	<i>Coleta e amostras</i> .....	57
3.9.3	<i>Avaliação da peroxidação lipídica e quantificação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico - TBARS</i> .....	57
3.9.4	<i>Determinação de grupos sulfidrílicos não proteicos (Glutathione-GSH)</i> .	57
3.9.5	<i>Mensuração da atividade da Mieloperoxidase (MPO)</i> .....	58
3.9.6	<i>Mensuração da atividade da Transaminase glutâmico pirúvico (TGP) e Transaminase glutâmico oxalácetico (TGO)</i> .....	58
3.10	<b>Riscos e benefícios da Pesquisa</b> .....	59
3.11	<b>Análise Estatística</b> .....	59
4	<b>RESULTADOS</b> .....	60
4.1	<b>Variação do peso dos animais durante o experimento</b> .....	60
4.2	<b>Avaliação do Estresse Crônico Moderado e Imprevisível pelo Teste de Preferência a Sacarose</b> .....	62

<b>4.3</b>	<b>Efeitos Eletroacupuntura (100 Hz) e do Trans-anetol sobre os parâmetros bioquímicos .....</b>	<b>62</b>
<b>4.3.1</b>	<b><i>A Eletroacupuntura e/ou Trans-anetol não alteram as dosagens de TGO e TGP em animais com depressão induzida por ECMI.....</i></b>	<b>62</b>
<b>4.3.2</b>	<b><i>A Eletroacupuntura e/ou Trans-anetol reduzem a mieloperoxidase (MPO) hepática.....</i></b>	<b>64</b>
<b>4.3.3</b>	<b><i>A Eletroacupuntura e/ou Trans-anetol reduzem TBARS plasmático e hepático.....</i></b>	<b>66</b>
<b>4.3.4</b>	<b><i>A Eletroacupuntura e/ou Trans-anetol aumentam Níveis de Glutathiona plasmática e hepática.....</i></b>	<b>68</b>
<b>4.4</b>	<b>Principais efeitos anti-inflamatório e anti-oxidante da Eletroacupuntura 100Hz e/ou Trans-anetol.....</b>	<b>71</b>
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>73</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>80</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>81</b>
	<b>APÊNDICE A – APROVAÇÃO NO COMITÊ DE ÉTICA PARA USO DE ANIMAIS (CEUA).....</b>	<b>102</b>
	<b>APÊNDICE B – PROTOCOLO OPERACIONAL PADRÃO .....</b>	<b>103</b>
	<b>APÊNDICE C – CRONOGRAMA DOS ESTRESSORES .....</b>	<b>112</b>
	<b>APÊNDICE D – VALORES DOS ANESTÉSICO POR PESO.....</b>	<b>113</b>
	<b>APÊNDICE E – PESO DOS ANIMAIS EM VALORES ABSOLUTOS .....</b>	<b>114</b>
	<b>APÊNDICE G – RESULTADOS DA AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA EM VALORES ABSOLUTOS .....</b>	<b>115</b>

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Depressão: panorama e características epidemiológicas

A depressão é uma doença psiquiátrica grave que envolve sintomas como humor deprimido ou triste, perda de interesse ou prazer em atividades, mudanças de peso, disfunção do sono, perda de energia, sensação de inutilidade, alterações psicomotoras e pensamentos suicidas frequentes. Difere das oscilações de humor habituais pelo estado de cronicidade e pela ausência de enfrentamento aos problemas cotidianos mais simples. Isso impacta em prejuízos na qualidade de vida e nas relações interpessoais (GOTLIB; JOORMANN, 2010; BRHLIKOVA *et al.*, 2011; JUNMEI *et al.*, 2012; ARAUJO, 2014).

É um dos distúrbios psicológicos mais prevalentes no mundo, atingindo cerca de 168 milhões de pessoas, com perspectiva de se tornar a segunda maior patologia incapacitante nos próximos anos, perdendo apenas para as patologias cardiovasculares (OMS, 2012). Tem como um dos principais desfechos o suicídio, implicando em aproximadamente 1 milhão de atentado a vida a cada ano (ABELHA, 2014).

No Brasil, estima-se que existam 5,8% de casos de depressão e ansiedade diagnosticados. Calcula-se, ainda, que 54 milhões de pessoas tem alta probabilidade de desenvolver ansiedade e/ou depressão em algum momento de suas vidas, sendo que 7,5 milhões terão episódios agudos e graves. Esses dados tornam o Brasil o país com um dos maiores índices de depressão da América Latina, e o segundo das Américas, perdendo apenas para os Estados Unidos. Esses dados se tornam mais alarmantes quando 15,6% dessas pessoas com depressão tiveram como desfecho o suicídio, sendo um valor considerando, ainda, subestimado (NARDI, 2000; MEDEIROS *et al.* 2018; SOUZA, 2018).

Embora os tratamentos farmacológicos estejam associados ao alívio de até 70% dos sintomas agudos, alguns dados apontam falhas na terapêutica usada atualmente. Daqueles que tem acesso a medicação adequada 64% não conseguem recuperação absoluta, 19% dos pacientes tem ausência de qualquer melhora mesmo com uso adequado e daqueles que possuem resposta 15% a 50% terão recorrência da depressão. Desse modo, os estudos mostram que as alternativas farmacológicas atuais estão longe de ser clinicamente satisfatórias (JUNMEI *et al.*, 2012).

Devido a esse cenário de ineficiência terapêutica associado a alta prevalência da doença os impactos da depressão e da ansiedade são inúmeros. Estima-se que sejam responsáveis por uma perda anual de produtividade de mais de um trilhão de dólares. Mas, a

expectativa é um prejuízo ainda maior, devido a lacuna de investimento na saúde mental, no tratamento farmacológico contínuo, nos tratamentos alternativos, além do constante crescimento de tolerabilidade e resistência aos tratamentos atuais, e presença de efeitos adversos que dificulta e/ou impossibilita a adesão terapêutica de modo eficaz e, conseqüentemente, impactam na sociabilidade do indivíduo. Assim, é considerada um problema de saúde pública, cujo ônus leva, não somente a perda monetária, mas, também, a perda social, laboral, e, não muito raramente, perda da própria vida (RAZZOUK, 2016; MRAZEK *et al.* 2014).

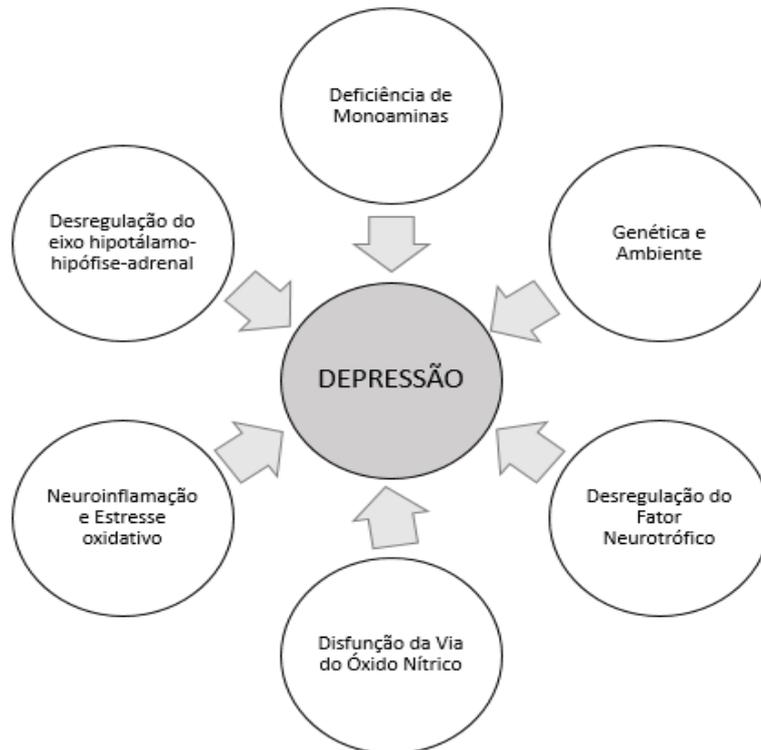
Dentro desse contexto ainda se soma a presença constante de comorbidades nesses indivíduos. Seja pela predisposição genética associado com outras doenças psiquiátricas e neurológicas, como ansiedade e doença de Parkinson ou pelo estado inflamatório crônico que o corpo está sendo exposto, podendo desencadear o desenvolvimento de afecções de órgãos específicos, como hepatopatias, que dentro desse contexto multipatológico, podem associar-se a uma negligência de autocuidado (GOTLIB; JOORMANN, 2010; YOUSSEF *et al.*, 2013).

## **1.2 Fisiopatologia da depressão**

É uma afecção ocasionada por diversos fatores, cujos mecanismos ainda não são bem elucidados, sendo motivo de grande discussão em meio à sociedade científica. Atualmente, há uma grande progressão dos estudos envolvendo a neurobiologia da depressão e, se em 1965 a fisiopatologia se restringia apenas a hipótese monoaminérgica, outras teorias embasam sua complexidade, incluindo a interação de vários fatores psicológicos, biológicos e sociais (ARAUJO, 2018).

Existem inúmeras hipóteses relacionadas aos mecanismos fisiopatológicos do transtorno depressivo e sua intercorrelação, das quais destacam-se seis: a deficiência de monoaminas, a predisposição genética e interferência de fatores ambientais, as alterações na função do receptor dos fatores neurotrófico, a desregulação da via do óxido nítrico, neuroinflamação e estresse oxidativo, desregulação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (Figura 1) (CHOPRA *et al.*, 2011; KERN *et al.*, 2012; ARAUJO, 2018).

Figura 1 - Mecanismos fisiopatológicos do transtorno depressivo.



Fonte: adaptado de Araújo (2018).

### ***1.2.1 Deficiência de monoaminas***

Como já abordado, uma das teorias pioneiras, relaciona-se com a deficiência da atividade monoaminérgica no cérebro (ARAÚJO, 2018). Constituída por uma disfunção tanto na síntese, como armazenamento ou liberação das monoaminas que levam a uma diminuição da norepinefrina, serotonina e dopamina na fenda sináptica. Outra explicação associada a essa teoria seria, ainda, alterações dos receptores e/ou mensageiros intracelulares ativados por esses neurotransmissores (ELHWUEGI, 2004). Essa hipótese é, até então, uma das principais, visto que é fonte dos principais alvos farmacológicos para depressão (NEMEROFF, 2007; FERRARI; VILLA, 2017; ARAÚJO, 2018).

### ***1.2.2 Predisposição genética e interferência de fatores ambientais***

Outra teoria se relaciona com os fatores genéticos, cujo papel fundamental no desenvolvimento da depressão ocorre tanto pelas interações gene-gene, como pela interação gene-ambiente (LESCH, 2004). No qual, reúnem mecanismos extremamente complexos que

envolvem polimorfismo e desregulações. Dentre os genes relacionados com maior vulnerabilidade ao transtorno, destacam-se os que regulam as funções do receptor 5-HT<sub>2A</sub>, o polimorfismos da região promotora do gene do transportador da serotonina (5HTT<sub>PR</sub>), genes que regulam as funções da enzima monoamina oxidase (MAO), da catecol-O-metiltransferase (COMT), e do fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF), cujo papel tem importante correlação com a próxima teoria aqui elencada com alteração do fator neurotrófico, como veremos a seguir (MILLER *et al.*, 2009; ARAUJO, 2018).

### ***1.2.3 Alterações no fator neurotrófico e seus receptores***

Os fatores neurotróficos são proteínas reguladores da neurogênese, diferenciação neural, plasticidade e morte celular. A redução desses fatores em determinadas áreas cerebrais parecem ser um dos mecanismos fisiopatológicos envolvidos na depressão associada ao estresse. Já que o estresse aparece como principal fator desencadeador da desregulação neurogênica, com redução do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) por excesso de glicocorticóides, um dos principais mecanismos da neuroinflamação, assim alteram os mecanismos transcricionais normais nas regiões límbicas, levando a redução de arborização dendrídica. Essa é uma região responsável processamento de emoções e cognição, sua atrofia resulta em distúrbios do humor (BERTON; NESTLER, 2006; PALLAVI *et al.*, 2013; POSSAMAI, 2013; BUMB *et al.*, 2015; BILGEN *et al.*, 2014; BUS; MOLENDIJK, 2016; ARAUJO, 2018).

### ***1.2.4 Desregulação da via do óxido nítrico***

O óxido nítrico como elemento da fisiopatologia da depressão vem sendo estudado desde 1996, quando Finkel e colaboradores usaram em seu experimento a paroxetina como inibidor seletivo da recaptação de serotonina (ISRS) e perceberam seu efeito sobre a enzima responsável pela síntese de NO a partir de L-arginina (ARAUJO, 2018).

Foi constatado, então, sua capacidade de difusão livre através das membranas celulares (não sendo armazenado em vesículas sinápticas e liberado por exocitose) e sua multiplicidade de alvos, participa de diversos processos fisiológicos do organismo, como na neurotransmissão, plasticidade sináptica, processos associados à aprendizagem, percepção da dor, agressividade e depressão (DHIR; KULKAMI, 2011). Além disso, tem um papel importante na cascata do estresse oxidativo.

### **1.2.5 Neuroinflamação e estresse oxidativo**

Ocorre por meio de um estado inflamatório sistêmico retroalimentada pelos hormônios e catecolaminas que desencadeia, entre outros efeitos, a produção de citocinas como IL-6, TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , que reforçam e intensificam o estado inflamatório, além de desencadear ativação da micróglia e gerar sintomas como stress, fadiga, depressão (BACELAR JÚNIOR, A. J *et al.* 2016), como será abordado mais detalhado a seguir.

O estresse oxidativo é um dos mecanismos do estado pró-inflamatório definido como desequilíbrio entre agentes pró-oxidantes e antioxidantes, no qual o desbalanço pode levar a produção de radicais livres (RL) que são produtos instáveis, e podem se ligar a diversas células, incluindo os neurônios levando a um processo de neuroinflamação impactando no processo de adoecimento na depressão (BIRBEN *et al.*, 2012; PALTA *et al.*, 2014; LUSHCHAK, 2014; LIGUORI *et al.*, 2018; HAN *et al.*, 2018).

### **1.2.6 Desregulação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal**

O eixo HPA tem como um dos principais produtos finais a produção de glicocorticoide, hormônios que têm sido, comumente, vistos na patogênese da depressão associada ao estresse. Essa via é mantida pela alteração dos receptores de glicocorticoides (RG) que geram deficiência de feedback negativo do eixo pelos corticoides circulantes, o que desencadeia uma gama de cascatas intracelulares, que levam, entre outras reações, a ativação da micróglia, células responsáveis pela defesa neural, aumentando a ativação de proteínas pró-inflamatórias (JURUENA *et al.*, 2004; SWAAB *et al.*, 2005; YU *et al.*, 2008; STERNER; KALYNCHUK; STERNER, 2010; PEDRAZZOLI *et al.*, 2019).

## **1.3 Relação depressão e estresse**

O termo estresse pode ser definido como resposta fisiológica adaptativa, por meio de uma percepção cognitiva de estímulo imprevisível, culminando em uma resposta comportamental que altera a homeostase. Uma exposição crônica a esses estímulos pode gerar consequências prejudiciais ao indivíduo (KOOLHAAS *et al.*, 2011). Alguns estressores da vida diária apresentam um impacto importante na patogênese dos transtornos de humor, principalmente no desencadeamento de quadros depressivos (TIMMERMANS *et al.*, 2013; SCHUCH *et al.*, 2019).

Desse modo, o papel do estresse na fisiopatologia da depressão merece um destaque especial, já que cerca de 60% dos casos de episódios depressivos são precedidos por exposição a estressores, especialmente estressores psicossociais (JURUENA, 2014). Assim, o estresse, seja físico, em decorrência de comorbidades, ou psicológico, como rupturas, traumas psicológicos e dificuldades situacionais, tem papel fundamental, seja como um fator desencadeador ou agravante da doença (VISMARI *et al.*, 2008; KRISHNAN; NESTLER, 2008). É importante retomar que a vulnerabilidade à depressão é parcialmente genética e fatores não genéticos também exercem influência e interação de forma complexa na patologia da depressão (BAGOT *et al.*, 2014; HAN *et al.*, 2016).

A desregulação imune central transpassa entre a gênese e a consequência da depressão. Isso ocorre devido à ação de alguns fatores já citados que desencadeiam a ativação da micróglia, células responsáveis pela defesa no caso de lesão ou infecção, por meio de liberação de uma gama de moléculas que, dependendo do estímulo inicial, podem ser tróficas ou citotóxicas. Assim, ocorre a liberação adicional de citocinas inflamatórias o que diminui a plasticidade celular (DUMAN; MONTEGGIA, 2006), como será aprofundando a seguir.

### ***1.3.1 Estresse: estado pró-inflamatório sistêmico e seus impactos no Sistema Nervoso Central***

O eixo Hipófise-Pituitária-Adrenal (HPA), didaticamente, possui duas categorias de mecanismos de resposta ao estresse: a estimulação do sistema nervoso autônomo (SNA) e a produção de cortisol. Diversos estudos apontam que a desregulação desse eixo desempenha um papel central na patogênese da depressão (WILLNER, *et al.* 2013), pois incorpora as funções neurológicas e estímulos sensoriais à função endócrina e respostas imunológicas, inflamatória e oxidativa, sendo o principal sistema que ajuda o indivíduo a lidar com eventos estressantes, além de ter um importante papel sobre o encéfalo (BERTON; NESTLER, 2006; HERBERT *et al.*, 2006; PARIANTE; LIGHTMAN, 2008).

#### ***1.3.1.1 Sistema Nervoso Autônomo***

O SNA é responsável pelo estímulo agudo, capaz de provocar alterações rápidas diante de uma situação de luta ou fuga. A adrenalina e a noradrenalina são as principais catecolaminas envolvidas na regulação da resposta ao estresse pelo SNA, exercendo efeitos na função cardiovascular, no metabolismo energético e em muitos outros processos

fisiológicos dependo do estímulo e do receptor envolvido (CARRASCO *et al.*, 2003; ULRICH-LAI *et al.*, 2009; PEREIRA; RIBEIRO, 2017).

O estresse promove estímulo ao eixo HPA que, pelo hormônio adrenocorticotrófico, desencadeia tanto produção de cortisol pelo córtex da glândula adrenal assim como a produção de catecolaminas como a adrenalina pela medula dessa glândula. A cronificação do estresse além de promover uma maior estimulação do eixo, leva a uma exaustão metabólica, oxidação das catecolaminas, desgaste de oxigênio e produção de espécies reativas de oxigênio (JURUENA *et al.*, 2004; PEREIRA; RIBEIRO, 2017).

Os órgãos linfoides também parecem sofrer ação do estresse por meio do SNA, pois são inervados por fibras nervosas noradrenérgicas onde há produção de norepinefrina, substância P e outros neurotransmissores nas junções neuroefetoras. Estimulam a produção da medula óssea e a liberação de células mielóides (por exemplo, monócitos) que entram na periferia onde encontram problemas moleculares associados ao dano induzido pelo estresse (MILLER *et al.*, 2016). Somado a isso, o sistema parassimpático, via o nervo vago, contribui para a conexão bidirecional entre o cérebro e o sistema imunológico. Por meio dessas vias, os sistemas nervoso e endócrino podem exercer um efeito direto sobre o sistema imunológico (PEREIRA; RIBEIRO, 2017).

#### *1.3.1.2 Eixo Hipófise-Pituitária-Adrenal e produção de glicocorticoides*

A ação dos glicocorticoides no organismo parecem seguir duas categorias de mecanismos. Uma está relacionada ao local de atuação do cortisol, o qual tem ação anti-inflamatória sistêmica e uma ação pró-inflamatória neural. Outra categoria seria seu tempo de resposta, que se relaciona com sua liberação diária (basal), sua resposta a um estímulo agudo, ou, ainda, sua resposta a cronificação desse estímulo, levando a um desbalanço do feedback negativo do eixo (CONSTANZO, 2014).

No estímulo basal uma das principais características do cortisol é sua natureza pulsátil e seu padrão diário. Sua secreção, pela zona fasciculada, é regulada pelo eixo hipotálamo-hipofisário, onde o núcleo paraventricular do hipotálamo secreta hormônios liberadores de corticotrofina (CRH), que na hipófise anterior promove a liberação do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), atuando no córtex da glândula adrenal promovendo a síntese e liberação de glicocorticoides, como, por exemplo, do cortisol em humanos e do corticosterona em roedores. Possuem grande afinidade pelos receptores de corticosteroides,

sendo ocupados mesmo em níveis baixos (GONCHAROVA, 2013; FILHO, 2014; COSTANZO, 2014).

Na situação de um a resposta sistêmica há um aumento imediato e acentuado da secreção de ACTH pela hipófise anterior, seguido, minutos depois, por grande aumento da secreção adrenocortical de cortisol. Cujo objetivo é o bloqueio da maior parte dos fatores que favorecem a inflamação e garantir subsídios para regeneração tecidual, por meio da inativação ou remoção de produtos inflamatórios, mobilização de aminoácidos, do estímulo da gliconeogênese e disponibilidade de ácidos graxos para a produção de energia celular (AGUILERA *et al.*, 2007; HALL, 2017).

Para o retorno aos níveis basais, o corpo comanda uma retroalimentação negativa no eixo hipotálamo-hipófise, onde o cortisol inibe diretamente a secreção de CRH do hipotálamo, e indiretamente, a secreção de CRH, pelos efeitos sobre os neurônios do hipocampo, que fazem sinapse no hipotálamo, que por sua vez inibe adenohipófise, resultando em inibição da secreção de ACTH (CONSTANZO, 2014).

Porém, devido a uma ampla variedade de estressores do cotidiano ativarem o eixo HPA a produzir de glicocorticoide, este fica cronicamente elevado fazendo com que os mecanismos de controle inibitório sejam interrompidos e vias alimentação do circuito sejam reforçadas. Esse desbalçando ocorre, geralmente, pela anormalidade das respostas dos receptores a alta produção de corticoide e pelo feedback positivo das catecolaminas no eixo (JURUENA *et al.*, 2004).

De modo geral os glicocorticoides mediam suas ações, incluindo a regulação do feedback do eixo HPA, por meio de dois subtipos de receptores de corticosteroide intracelular: receptor mineralocorticoide (RM) e Receptor glicocorticoide (RG). O RM tem alta afinidade pelos corticosteroides endógenos, desempenhando papel na regulação das flutuações circadianas desses hormônios. O RG possui uma menor afinidade pelos corticosteroides endógenos. Portanto, acredita-se que o RG seja mais importante na regulação da resposta ao estresse quando os níveis endógenos de glicocorticoides estão altos (JURUENA *et al.*, 2004 ULRICH-LAI *et al.*, 2009; FILHO, 2014; XU *et al.*, 2019).

O RG inativado encontra-se no citoplasma associado ao complexo de proteínas chaperones. Quando acoplado ao esteroide, dissocia-se das chaperones e transloca-se para o núcleo, onde pode acoplar-se aos elementos de resposta glicocorticoide (ERGs) no DNA ou interagir com outros fatores de transcrição, onde podem designar uma regulação de feedback negativo aos genes aos quais estão acoplados (JURUENA *et al.*, 2004).

Apesar de possuírem uma baixa afinidade com os glicocorticoides, os RGs têm uma alta capacidade para sinalizar seu aumento e cessar a sua produção em períodos de estresse agudo. De modo anormal, o estresse crônico parece esgotar as reservas de RG no nível límbico-hipocampal. Esse mecanismo o torna mais resistência ao cortisol, reduzindo sua capacidade de sinalização, podendo levar superprodução de glicocorticóides indefinidamente (JURUENA *et al.*, 2004; MARZZNI, 2018).

O mais curioso dessa hipercortisolemia é o fato de que os pacientes com depressão decorrente de estresse crônico não exibem tipicamente os sintomas físicos desse excesso, sugerindo que os RGs periféricos possam também ser anormais ou insensíveis. Um dos impactos dessa alteração sistêmica dos receptores é a perda da função de supressão imune típica do corticoides, habilitando os linfócitos e outras células inflamatórias a responderem com menos intensidade aos glicocorticoides (JURUENA *et al.*, 2004).

No cérebro, as alterações dos RG em exposição a excesso de glicocorticoides, promovem além de sustentação do eixo HPA, cascatas de reações pró-inflamatórias que levam a ativação da micróglia, células responsáveis pela defesa neural, aumentando a ativação de proteínas pró-apoptóticas, e consequente redução de fatores neurotróficos (SWAAB *et al.*, 2005; YU *et al.*, 2008; STERNER; KALYNCHUK, 2010; PEDRAZZOLI *et al.*, 2019).

Desse modo, a alteração dos RG no SNC pode acarretar redução da taxa de secreção de proteínas específicas e produção de mediadores inflamatórios que podem causar atrofia hipocampal e redução da produção de monoaminas cerebrais (MALYKHIN; COUPLAND, 2015), apresentando-se sintomaticamente com ausência de prazer, fadiga, perda de apetite e libido, hipersensibilidade à dor, entre outros, culminando na depressão (TSIGOS *et al.*, 2002; MILLER *et al.*, 2009; JOELS; BARAM 2009; SOUZA, 2018).

Diversos estudos confirmam essas hipóteses, demonstrando que a concentração de glicocorticoides parece está elevada em mais de 50% dos pacientes depressivos (NESTLER *et al.*, 2002), evidenciado por aumento do cortisol livre urinário, elevação dos níveis de CRH em líquido cefalorraquidiano, ausência de liberação pulsátil e uma diminuição da supressão do cortisol por dexametasona. Algumas condições das quais puderam ser revertidas por tratamento com antidepressivos, demonstrando a existência de correlação entre as vias (NESTLER *et al.*, 2002; SOUTHWICK, *et al.*, 2005; STERNER; KALYNCHUK, 2010; ARAUJO, 2018).

Além disso, alguns estudos de imagem demonstraram uma hipertrofia das adrenais associado a uma hiperatividade do sistema nervoso simpático, redução das

catecolaminas cerebrais e sustentação dos níveis plasmáticos de cortisol. Além disso, os pacientes depressivos cursaram com redução no volume do córtex pré-frontal e do hipocampo, demonstrando que o estresse pode levar a atrofia e morte dos neurônios hipocampais e, também, a redução da neurogênese (FILHO, 2014; SILVA, 2015).

Lembrando que o hipocampo e o córtex pré-frontal participam de funções importantes como memória, aprendizado, atenção e impulsos, tomada de decisões, bem como modulação autonômica e endócrina de resposta ao estresse. Nesse sentido, sugere-se que alterações funcionais nestas áreas parecem favorecer o desenvolvimento de transtornos mentais, como ansiedade e depressão. Além de mediar aspectos cognitivos da depressão decorrente do estresse, tais como deficiências de memória e sentimento de culpa, desesperança e suicídio (CZEH *et al.*, 2008; HOLMES; WELLMAN, 2009; OLIVEIRA, 2019)

### *1.3.1.3 Imunologia e produção de citocinas*

No estado fisiológico, a produção de citocinas e suas concentrações na circulação são geralmente baixas. Porém, quando há uma agressão ao corpo há uma cascata de respostas imunes que eleva a produção de interleucinas (IL) e outras citocinas. As principais citocinas pró-inflamatórias são as IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, IL-12, o Fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) e Interferon gama (IFN-  $\gamma$ ) que promovem inflamação por meio de ativação dos macrófagos, células T e células B, células NK, proliferação e secreção de imunoglobulinas em prol da eliminação da agressão e na resolução do processo (FAROOQ *et al.*, 2017).

No caso do estresse essa cascata é desencadeada pelos próprios hormônios e catecolaminas circulantes. Como o organismo não consegue eliminar o agressor, há persistência da resposta, o que pode ocasionar uma progressão na inflamação, causando um estado inflamatório sistêmico, fenômeno de baixa intensidade, assintomático, crônico e sistêmico. Citocinas como IL-6, TNF-  $\alpha$  e IL-1  $\beta$ , mudanças no número e na função das células do sistema imune inato, além de alteração na expressão e sinalização dos receptores de reconhecimento padrão parecem estar no cerne dessa cascata (SIQUEIRA *et al.*, 2016).

No cérebro, as citocinas são responsáveis pela ativação neuroendócrina e neuronal. Elas regulam o crescimento e a proliferação das células gliais, modulam a atividade dos peptídeos opióides endógenos e ativam o eixo HPA. Além disso, podem afetar o metabolismo dos sistemas noradrenérgico, serotoninérgico e dopaminérgico. Assim,

produzem diversas alterações comportamentais compatíveis com a depressão (MARZZNI, 2018).

Para que ocorra neuroinflamação, o processo inflamatório pode ter origem no sistema nervoso central (SNC) e/ou sistema nervoso periférico (SNP) e se propagar para o SNC. Assim algumas das rotas de propagação são a barreira hemato-encefálica, o nervo vago, o sistema linfático, e a principal via de produção pelo SNC são as células da micróglia (MARZZNI, 2018).

Assim, as citocinas chegam no SNC através da barreira hemato-encefálica enfraquecida ou ausente (como ocorre nos órgãos circumventriculares e plexo coroide), ou ainda, por meio do nervo vago onde as citocinas periféricas podem se ligar aos receptores nas células do paragânglios, ativando a região do córtex cerebral onde o vago se projeta, no núcleo do trato solitário, ou pelo sistema linfático que perpassam os seios durais responsáveis por transportar as células imunológicas (LOUVEAU *et al.*, 2015).

Após a entrada no SNC, as citocinas podem propagar o mecanismo por meio de efeitos nos neurônios produtores de hormônio liberador de corticotrofina, causando manutenção do eixo HPA e o estresse sistêmico, ou podem atuar nas células endoteliais da vasculatura cerebral ou, ainda, nas células gliais nos órgãos circum ventriculares, induzindo a síntese e a liberação de mensageiros secundários que, por sua vez, ativam os neurônios do hipotálamo, levando a neuroinflamação (MARZZNI, 2018).

A micróglia é considerada um dos principais sistemas de defesa do SNC, compondo cerca de 16% das células cerebrais. Tem papel semelhante aos macrófagos no SNC, possuindo funções importantes como monitoramento de sinapses, recolhimento de células apoptóticas, entre outras. Sua ativação, em situações patológicas, resulta apresentação de antígenos, produção de fatores citotóxicos e neurotróficos e fagocitose de substâncias indesejadas (SIQUEIRA, 2016)

No estresse, a capacidade de discriminar neurônios viáveis de inviáveis parecem esta alteradas, levando a fagocitose de neurônios viáveis e liberação de conteúdo intracelular, como glutamato, alterando microambiente neural, esse processo leva ainda mais produção de citocinas pró-inflamatórias e liberação de TNF- $\alpha$ , que podem causar uma ativação citotóxica e gera destruição de sinapses e dendrito, acarretando em doenças neurodegenerativas. (POCOCK; KETTENMANN, 2007; NEHER *et al.*, 2013).

O estado de ativação da micróglia pode ser desencadeado por dois subtipos de receptores com ações distintas: classicamente ativado (subtipo M1) e alternativamente ativado (subtipo M2) (SAIJO; GLASS, 2011). O fenótipo M1 está primariamente associado

a uma elevada expressão de níveis de citocinas pró inflamatórias como IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 e atração de células mielóides para o cérebro e com a indução de neurodegeneração, enquanto que o fenótipo M2 pode estar relacionado ao reparo tecidual ou a um estado de regulação, com produção de citocinas anti-inflamatórias como TGF $\beta$  e IL-10 (MILLER *et al.*, 2016; PANAGIOTAKOPOULOU *et al.*, 2019).

No cérebro cada citocina é capaz de modular uma ação diferente. A IL-2, por exemplo, pode diminuir a transmissão de norepinefrina e a transmissão dopaminérgica na área nigroestriatal (MARZZNI, 2018) e ainda tem a capacidade de induzir o desenvolvimento e propagação de linfócitos T e células B, estimula a produção de algumas citocinas, tais como, INF- $\gamma$  e TNF- $\beta$  com conseguinte estimulação de monócitos, neutrófilos e células natural killer (NK). A IL-8 proporciona uma sensação algica enviada pelo sistema nervoso simpático (BACELAR JÚNIOR *et al.*, 2016).

As citocinas IL-6, IL-1  $\beta$  e TNF-  $\alpha$  relacionam o estresse sistêmico crônico a neuroinflamação. A IL-6, por exemplo, relaciona-se com hipersensibilidade a dor (FAROOQ *et al.*, 2017). A IL-1 $\beta$ , por sua vez, reforça a inflamação sistêmica pela produção de prostaglandina E2 no hipotálamo, comanda a formação de substância-P (SP), a produção de óxido nítrico e promove adesão endotelial. Além disso se caracteriza como mediador inflamatório primário, estimulando o fator de transcrição nuclear kappa B (NF $\kappa$ B), que atua na resposta imunológica, provoca a formação de IL-8, INF- $\gamma$ , em conjunto com o TNF- $\alpha$ , ocasionam sintomas como estresse, fadiga, depressão (BACELAR JÚNIOR *et al.*, 2016; LEE; GIULIANI, 2019).

O TNF- $\alpha$  têm sido foco de diversas pesquisas pois tem se mostrado uma citocina participante de vários processos da neuroinflamação. É capaz de desencadear a apoptose pela ativação micróglia por meio de receptor TNF-R1 que desencadeia ação estímulo a cascata de caspase que induz a condensação e fragmentação nuclear e consequente apoptose, além de clivar o receptor de glicocorticóide, contribuindo para a resistência aos glicocorticoides (BACELAR JÚNIOR *et al.*, 2016). Somado a isso, parece ter impacto significativo na disponibilidade extracelular receptor de serotonina pela ativação dos astrócitos, o que afeta a taxa de rotatividade desses neurotransmissores, resultando em uma diminuição de serotonina total do cérebro (MALYNN *et al.*, 2013).

As citocinas podem afetar o metabolismo e a disponibilidade das monoaminas por diferentes mecanismos, sendo um deles o aumento da expressão e a função das bombas de recaptação pré-sináptica, ou pela redução da síntese de monoamina através da redução de cofatores enzimáticos ou ainda pela redução a disponibilidade de triptofano para a síntese de

serotonina, dopamina e norepinefrina ou ainda por aumentar a metabolização de triptofano em ácido quinolínico, uma substância neurotóxica e pró-inflamatória implicada em transtornos neurodegenerativos. O ácido quinolínico é também um agonista de receptores N-metil D-aspartato (NMDA) que prejudica o feedback negativo dos glicocorticóides e causa atrofia hipocampal e perda de receptores de glicocorticóides (MARZZNI, 2018).

A reação inflamatória mediada por citocinas ainda perpassa pelo recrutamento de leucócitos. Os neutrófilos são leucócitos que desempenhando um papel fundamental na imunidade inata. Normalmente, degranulam no local de patógenos para que haja progressão para cura da doença. Mas qualquer expressão incomum, principalmente, de estresse oxidativo, a partir de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), parece ser capaz de desencadear a liberação de mieloperoxidase (MPO) pelos neutrófilos ativados, conduzindo a formação de ácidos letais ao microambiente (KHAN *et al.*, 2018).

No cérebro a mieloperoxidase também gera intermediários reativos que estimulam a peroxidação lipídica. Também há produção de ácido, em especial o ácido hipocloroso (HOCl<sup>-</sup>), um composto extremamente reativo e tóxico para as células neurais, estando envolvido em várias doenças neurodegenerativas, incluindo depressão. Ainda é capaz de ativar o sistema pró-inflamatório central (astrócitos e micróglia) a produzir IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IFN- $\gamma$  e comanda estímulo para células inflamatórias periféricas fazendo com que haja um ciclo de manutenção do estado inflamatório (ROMAN *et al.*, 2008; CRUZ; CAMPA, 2009; RAY *et al.*, 2016).

Curiosamente, o parênquima cerebral normal raramente expressa MPO, mas a micróglia ramificada ativada está ligada a níveis mais altos de MPO enzimaticamente ativo em cérebros doentes. Desse modo a enzima mieloperoxidase torna-se um biomarcador importante no reconhecimento de doenças inflamatórias e neurodegenerativas, pois possibilita demonstrar o componente inflamatório de forma quantitativa (BRADLEY *et al.*, 1995; CRUZ; CAMPA, 2009; RAY *et al.*, 2016; KHAN *et al.*, 2018; MARZZNI, 2018).

A relação entre depressão e inflamação pode ser ratificada por meio de diversos estudos clínicos relacionados a alta incidência de depressão em pacientes tratados com citocinas, como, por exemplo, o uso de INF- $\alpha$  ou IFN- $\gamma$  usado no combate a infecções e alguns tipos de cânceres (RAISON *et al.*, 2005). Somado a isto, Filho (2014) também verificou o aumento nos níveis de diversas citocinas principalmente as IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$  em adultos depressivos, tendo seus valores restaurados aos níveis basais após incremento de terapia antidepressiva. E tendo ainda, relação com estresse social em humanos, resultando na ativação do eixo HPA e suas consequências metabólicas, como diabetes mellitus e doença

cardíaca coronarianas. E estando também elevados em paciente com transtornos pós-traumático (CHOPRA *et al.*, 2011; BACELAR JÚNIOR *et al.*, 2016; ARAUJO, 2018).

Além disso, IL-1 $\beta$  também se apresentou elevada em pacientes deprimidos e previamente não medicados apresentavam concentrações mais altas de citocina pró-inflamatória. Outro estudo constatou um aumento proporcional de IL-1 $\beta$  gravidade da depressão, principalmente em pacientes com ideação suicida. E também estava aumentada em pacientes com sintomas de depressão pós-parto. Estudos de imagem correlacionaram o aumento dessa citocina e diminuição na proliferação de células do hipocampo (BACELAR JÚNIOR *et al.*, 2016; FAROOQ *et al.*, 2017)

Outros estudos ainda mostraram um aumento no número de leucócitos e MPO; elevação na concentração plasmática de proteínas de fase aguda (como a proteína C reativa); diminuição na resposta celular a mitógenos; redução do número de linfócitos e da atividade de células NK; alteração na expressão de antígenos associado a depressão (SELEK *et al.*, 2015; MARZZNI, 2018).

Desse modo, uma vez no cérebro, a resposta inflamatória pode afetar as vias metabólicas e moleculares que influenciam os sistemas de neurotransmissores que podem afetar os neurocircuitos que regulam o comportamento, especialmente comportamentos relevantes à diminuição da motivação (anedonia), prevenção e alarme (ansiedade), que caracterizam vários distúrbios neuropsiquiátricos, incluindo depressão (MILLER *et al.*, 2009; KIM *et al.*, 2007; DANTZER; KELLEY, 2007; LEONARD; MAES, 2012; MILLER *et al.*, 2016).

#### *1.3.1.4 Estresse Oxidativo e Mecanismo antioxidantes*

O desequilíbrio entre agentes pró-oxidantes e antioxidantes tem como resultado a produção de espécies reativas de nitrogênio (ERNs) ou/e espécies reativas de oxigênio (EROs), produtos que compõem um processo normal no metabolismo aeróbio das mitocôndrias que resultam em produção de radicais livres. Os radicais superóxido ou radicais hidroxila, são moléculas extremamente reativas, pois contêm um ou mais elétrons não pareados, com capacidade de retirar elétrons de outros compostos celulares em busca da estabilidade (BIRBEN *et al.*, 2012; BLACK *et al.*, 2015; PALTA *et al.*, 2014; ROBACZEWSKA *et al.*, 2016; HAN *et al.*, 2018).

Desse modo, em condições fisiológicas, EROs funcionam como importantes sinalizadores intracelulares e, em concentrações baixas, são essenciais para a regulação da

autofagia, modulação da resposta imune, proliferação celular e indução adequada da plasticidade sináptica e formação de memória. Embora essenciais para a sobrevivência, estes processos podem ser ativados impropriamente causando lesões aos neurônios por combina-se com células endógenas levando a dano estrutural aos lipídios (principal constituinte das membranas), proteínas e DNA, podendo resultar em morte celular, principalmente quando somado a isso há diminuição das defesas antioxidantes e promovendo a neurodegeneração (CHOPRA *et al.*, 2011; PALTA, *et al.* 2014; BLACK, *et al.* 2015).

Mas, de modo geral, essas lesões não ocorrem já que existe um sistema de equilíbrio antioxidante capaz de neutralizar as EROs e ERNs produzidas. Estes agentes antioxidantes podem ser classificados em enzimáticos, dentre os quais se destacam a enzima superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutatona redutase (GR) e glutatona peroxidase (GPx), e não enzimáticos, como a glutatona reduzida (GSH) (BIRBEN *et al.*, 2012; PALTA *et al.*, 2014).

A glutatona pode ser considerada um dos agentes mais importantes do sistema de defesa antioxidante da célula. É formada no fígado a partir de glicina, glutamina e cisteína, catalisados pela  $\gamma$ -glutamyl-cisteina-sintetase e pela glutatona-sintetase e distribuída através da circulação sanguínea. Na célula a glutatona reduzida (GSH, L- $\gamma$ -glutamyl-L-cisteinil-glicina) pode sofrer oxidação pela ação enzimática da glutatona redutase e torna-se glutatona oxidada (GSSG), um composto tóxico para o meio intracelular (BIRBEN *et al.*, 2012; MAES *et al.*, 2011; FREITAS *et al.*, 2014).

A GSH em sua forma reduzida possui inúmeras funções metabólicas como reações de biorredução, proteção contra radicais livres, processos de transporte, intensificador imunológico por meio da produção de glóbulos brancos, destoxificação de xenobióticos e tóxicos endógenos como enxofre, metabolismo do nitrogênio, entre outros, mas destaca-se pelo seu alto poder antioxidante. Assim, a resistência celular contra a lesão oxidativa está associada com elevados níveis intracelulares de glutatona reduzida, o que tem sido alvo de muitos estudos (HUBER *et al.*, 2008; CRUZ, 2016).

Diversos mecanismos são propostos para explicar a sensibilidade do SNC a ao estresse oxidativo como a degradação de neurotransmissores, a ativação das células da glia, o alto consumo de oxigênio pelas células neurais, a alta prevalência de ferro e cobre envolvidos em diversas reações de neurotransmissão, a abundância de ácidos graxos insaturados entre outros. Condições que fazem das células nervosas carentes de defesas antioxidantes, resultando em destruição oxidativa dos neurônios que, por sua vez, libera restos celulares no microambiente que são passíveis de oxidação, desencadeando um ciclo vicioso,

capaz de levar a neurodegeneração (LLESUY, 2002; HALLIWELL, 2006; FREITAS *et al.*, 2014; PALTA *et al.*, 2014).

Um exemplo desse mecanismo é oxidação de neurotransmissores. De modo geral, a oxidação dos neurotransmissores ocorre por meio da enzima monoamina oxidase (MAO), reagem com  $O_2$  gerando o ânion radical superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e quinonas e semiquinonas reativas, que em situações fisiológicas são neutralizadas pela glutatona (GSH), mas de modo crônico podem levar ao esgotamento dessa substância (MOURA, 2012).

O glutamato, por exemplo, é um dos principais neurotransmissores no cérebro e está susceptível a diversas desregulações. Situações pelas quais o glutamato pode se acumular na fenda sináptica e desencadeiam a despolarização excessiva do neurônio pós-sináptico e, conseqüentemente, distúrbios da homeostasia iônica e energética, ativação de enzimas líticas mediada por  $Ca^{+2}$ , geração de radicais livres, lesão mitocondrial e edema osmótico, podendo levar à lise celular e morte, que por sua vez leva a mais liberação de glutamato, resultando na ativação da fosfolipase A2 e da óxido nítrico sintase (NOS) neuronal e à liberação de ácidos graxos e produção elevada de óxido nítrico ( $NO^{\bullet}$ ) (BARBOSA *et al.*, 2010).

As células da glia, como a micróglia, parecem contribuir com esse processo por migrar para áreas danificadas e produzir superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e  $NO^{\bullet}$ , além de liberar citocinas, como já visto (POCOCK; KETTENMANN, 2007). Os astrócitos é uma das principais células de defesa antioxidante no tecido nervoso. Mas, por vezes, acabam contribuindo para o processo oxidativo, pois são mais vulneráveis a desbalanços metabólicos e mitocondriais. Sua capacidade de sequestrar espécies reativas de oxigênio (EROs) é reduzida devido à diminuição na liberação de enzimas antioxidantes. Desse modo, a capacidade de regular os níveis neurotransmissores na fenda sináptica, importante função astrocitária fica prejudicada. Esse processo é caracterizado pela elevação da concentração de glutamato extracelular e estimulação excessiva de receptores de glutamato, conhecido como excitotoxicidade do glutamato e responsável por perda sináptica e morte neuronal (GOMES *et al.*, 2013).

Outra maneira de incrementar a peroxidação lipídica é por meio do íon de ferro. Presente em muitas áreas do cérebro, estocado em sua maior parte na forma de ferritina e uma parte menor, no sítio ativo de enzimas e no fluido cérebro espinhal, complexados a transferrina, a qual se encontra totalmente saturada. Lesões no cérebro prontamente resultam

na liberação de íons ferro capazes de catalisar a formação de radical hidroxila (HO•), a peroxidação lipídica e a oxidação de neurotransmissores (BARBOSA, 2008).

Os ácidos graxos poli-insaturados das membranas neuronais compõem outro substrato para oxidação, por meio da peroxidação lipídica, a qual resulta no acúmulo de hidroperóxidos de lipídio (LOOH). Estes podem ser degradados na presença de íons de ferro ou cobre gerando radicais alcoxila (LO•) e peroxila (LOO•). Os radicais LO• e LOO• podem danificar proteínas de membrana e atacar outras moléculas de lipídio, propagando o processo oxidativo. Os produtos finais da decomposição de LOOH são inúmeros e incluem aldeídos altamente citotóxicos, como dialdeído malônico (MDA), acroleína, 4-hidroxi-2-trans-nonenal (HNE)1 e trans-2,4-decadialenal (DDE) (FERREIRA, 1997; BARBOSA, 2008).

As espécies reativas de oxigênio cursam com uma meia-vida muito curta sendo difíceis de medir diretamente. Em vez disso, o que pode ser medido são os vários produtos dos danos produzidos pelo stress oxidativo, como exemplo, a peroxidação lipídica, a oxidação de DNA, oxidação de proteínas equilíbrio antioxidante (PRYOR, 1991; MAES *et al.*, 2011; YOUSSEF *et al.*, 2013; ROBACZEWSKA *et al.*, 2016).

Assim, o MDA é um dos diversos produtos da decomposição de certos produtos de peroxidação lipídica. Os testes de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) medeiam a presença de malondialdeído na amostra, bem como o MDA gerado a partir de hidroperóxidos de lipídios pelas condições hidrolíticas da reação. Sendo a análise do MDA importante para se sugestionar um quantitativo de peróxidos graxos (OAKES, 2003).

A associação entre estresse oxidativo a depressão se fortifica por diversos estudos. Um desses estudos aponta a correlação de efeitos antioxidantes aos antidepressivos, no qual, diferentes classes de antidepressivos possuíam efeitos antioxidantes como um dos mecanismos de ação antidepressiva. Porém um dos entraves para o uso desses fármacos para esse fim seriam sua toxicidade e efeitos adversos, deixando ainda uma lacuna de como atingir essa via de mecanismo antidepressivo de modo mais seguro (LI *et al.*, 2000; KOLLA *et al.*, 2005; KUMAR *et al.*, 2011; FREITAS *et al.*, 2014).

Estudo sobre a síntese debilitada da glutathiona estria implicado na etiologia de algumas doenças neurodegenerativas tais como a doença de Alzheimer, doença de Parkinson, depressão entre outras (YANG *et al.*, 2013). E que as o metabolismo energético e da glutathiona são as vias biológicas mais significativamente alteradas no modelo de depressão em ratos submetidos a estresse crônico moderado e imprevisível (GIBSON *et al.*, 2012). Além disso o aumento de GSH também aumentou positivamente o nível da citocina anti-inflamatória e reduziu os níveis das citocinas pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-1 $\beta$ ),

atenuando as alterações na atividade das metaloproteinases em astrócitos tratados *in vitro* (BRAIDY,2019).

Outro estudo, dosou o estresse oxidativo por meio de concentrações do malondialdeído (MDA), foi então percebido que havia maior quantidade de MDA em pacientes deprimidos em comparação com grupos controle saudáveis. Os níveis elevados de MDA também têm sido identificados em pacientes com diagnóstico de transtorno depressivo recorrente, e as concentrações são ainda maiores em pacientes deprimidos com histórico de episódios recorrentes de depressão, em comparação com os doentes que sofrem de seu primeiro episódio (BACELAR JÚNIOR *et al.*, 2016)

Em vista disso, a prevenção do desequilíbrio entre a geração de radicais livres e o potencial antioxidante se mostrou importante para a redução da ocorrência ou exacerbação da neuroinflamação, e conseqüentemente, da depressão (HAN *et al.*, 2016).

Alguns estudos apontam que a produção e o desbalanço de EROs podem ser controladas por meio do uso de substâncias antioxidantes, que mesmo em pequenas concentrações possuem a função de inibir ou atrasar a oxidação de um substrato (IDELCHIK *et al.*, 2016). Sendo o sistema de defesa antioxidante não enzimático passível de obtenção exógena, o que é o foco de muitas terapias alternativas como nesse estudo (MORAIS, 2018).

### ***1.3.2 Estresse como um fenômeno sistêmico: uma relação entre inflamação, estresse oxidativo hepático e depressão***

Embora os mecanismos exatos entre os distúrbios mentais e a inflamação e o estresse oxidativo hepático ainda sejam obscuros, sabe-se que alguns mecanismos congruências entre as vias desempenham um papel fundamental na produção desses danos. Dentre eles destacam-se: o metabolismo dos fosfolipídios, a lesão oxidativa, a desregulação do eixo HPA e o desbalanço dopaminérgico (BARIS, *et al.* 2010).

Para elucidar a teoria do metabolismo dos fosfolipídios e estresse oxidativo Jia, Hong-Mei e colaboradores (2016), buscaram pesquisar pontos de interseção entre as vias metabólicas com potencial depressivo e injúria hepática. Os fosfolipídios apresentaram papel importante, pois desempenham função estrutural básica nas membranas e atua como substratos das reações. Como componente das biomembranas tem função de proteger as células e suas organelas do estresse oxidativo. Como substrato tem alta possibilidade de sofrerem oxidação (YOUSSEF *et al.*, 2013). Como resultado, apontaram um potencial de

estresse oxidativo elevado no tecido, peroxidação lipídica, dano inflamatório da membrana celular e até apoptose no fígado.

O dano inflamatório da membrana ainda pode ser dosado por meio das enzimas transaminase glutâmico pirúvica (TGP) e transaminase glutâmico oxalacética (TGO) pois são liberadas no sangue, entre outras condições, quando há dano à membrana do hepatócito o que contribui para o estresse oxidativo. Alguns estudos, porém, apontam que sua relação não é direta ao processo oxidativo (PAKNEJAD *et al.*, 2006).

Outra teoria seria por meio da ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA), como visto, produzindo hipersecreção de cortisol. O fígado desempenha um papel fundamental na adaptação da resposta neuroendócrina ao estresse quando sua atividade anabólica fornece os compostos ricos em energia, como glicose e lipídios, necessários para que o corpo possa se adaptar (VASQUEZ *et al.*, 2014).

No entanto, o estresse pode ter um efeito duplo (aumentando ou diminuindo) sobre o processo inflamatório que ocorre no fígado. A hipercortisolemia crônica induz a produção de mediadores inflamatórios por macrófagos estrelados, havendo síntese das citocinas pró-inflamatórias IL-1, IL-6 e TNF- $\alpha$ . Sendo ratificada pela análise de cortisol *in situ* no fígado que também induziu a produção de IL-6 e TNF- $\alpha$  por macrófagos estrelados, promovendo estresse oxidativo e inflamação (HUANG *et al.*, 2017; XUE *et al.*, 2018; MATT *et al.*, 2019; BIRKL-TOEGLHOFER *et al.*, 2019).

Somado a isso, esse eixo ainda contribui para deposição de tecido adiposo visceral, fonte importante de liberação de citocinas inflamatórias como IL -1 e IL-6 e o TNF- $\alpha$ . Essas anormalidades metabólicas desempenham um papel significativo no desenvolvimento e progressão da doença hepática gordurosa não alcoólica. Assim, foi levantada a hipótese de que problemas psicológicos estão associados a distúrbios metabólicos afetando órgãos extra-hepáticos e vias reguladora via acúmulo de gordura visceral (KOCHAR *et al.* 2018; JUNG *et al.*, 2019).

Alguns autores ainda relataram associação entre a gravidade da depressão/ansiedade ao grau de lesão hepática. Assim, uma investigação com 567 pacientes diagnosticados com esteatose hepática não alcoólica, dentre eles 14% a 53% apresentavam depressão clínica ou subclínica, respectivamente. Como conclusão apontou-se que a depressão tinha forte associação a degeneração (hidrópica) dos hepatócitos (ELWING, *et. al.*, 2006; SURDEA-BLAGA; DUMITRAȘCU, 2011; YOUSSEF *et al.* 2013).

Ainda no que tange a inflamação, os neutrófilos e os macrófagos possuem um papel importante nas lesões hepáticas assim como ocorre na neuroinflamação. Na esteato-

hepatite alcoólica em seres humanos ou em modelos animais, por exemplo, a infiltração de neutrófilos aumentam a granulopoiese, redução de produção de fator de crescimento de hepatócitos, degradação do colágeno e estresse oxidativo intracelular. Os macrófagos estrelados ou células de Kupffer, por sua vez, também sintetizam MPO. A identificação dessas células no tecido hepático compõe um forte preditor de fibrose hepática e indicam estresse oxidativo em curso (KHAN *et al.*, 2018).

Uma terceira via elucidativa se refere a produção e ação da dopamina. Embora seja um neurotransmissor, ela pode ser sintetizada na periferia, sendo responsável por ações como estimulação dos receptores adrenérgicos com efeito inotrópico e estimulação de receptores dopaminérgicos com aumento da resistência periférica e vasodilatação visceral, coronariana e cerebral (BRESSEL, 2008).

De acordo com estudos anteriores, algumas células do fígado são capazes de produzir dopamina, incluindo células dendríticas e células T reguladoras. As células T reguladoras parecem ser capazes de estimular mediadores anti-inflamatórios, tanto no fígado como no cérebro. A produção de glicocorticoide parece afetar drasticamente esse controle endógeno, desencadeando em ambos os órgãos, mecanismos distintos e colaborativo, de depleção de dopamina e fatores anti-inflamatórios. Assim há um reforço na produção de citocinas pró- inflamatórias, adesão celular, citotoxicidade e quimiotaxia que incrementam a inflamação hepática e neural (BESSER *et al.* 2005; COSENTINO *et al.* 2007), e afetam a sinalização dopaminérgica central e periférica (MILLER *et al.*, 2016; PEREIRA, 2019, MATT *et al.*, 2019).

### ***1.3.3 Estresse experimental no desenvolvimento da depressão***

#### ***1.3.3.1 Protocolo de Estresse Crônico Moderado e Imprevisível (ECMI)***

Como visto, a depressão em humanos é uma junção de fatores endógenos e fatores exógenos, influenciada por eventos estressantes e traumáticos ao longo da vida, acarretando, de modo crônico, em uma incapacidade de lidar com situações aversivas (KLOET *et al.*, 2005).

Assim, a maioria dos modelos depressivos em animais são baseados na exposição a uma variedade de estressores que tenta simular as exposições a estresse do cotidiano humano. São conjuntos de estímulos aversivos crônicos e moderados baseados em estresses agudo ou crônico e ininterrupto (no mínimo três semanas e no máximo seis semanas), por meios de estímulos leves, moderados ou fortes, que são aplicados em combinação de dois ou

mais tipos de estressores, tornando-os imprevisíveis (WILLNER *et al.*, 2005; CRYAN; HOLMES, 2005).

Esse modelo experimental induz nos animais submetidos ao ECMI um comportamento denominado anedonia, comportamento similar a depressão do tipo melancolia, que em humanos está associado falta de reatividade, humor deprimido, tristeza, perda de peso, insônia, agitação psicomotora (WILLNER *et al.*, 1987; POST; WARDEN, 2018). Estudos utilizando ECMI em ratos demonstraram comportamento depressivo, manifestado por variação na ingestão de alimentos (TANNENBAUM *et al.*, 2002), perda de peso corporal (WILLNER, 1997) e diminuição na atividade motora (STREKALOVA *et al.*, 2004), entre outros (MATTHEWS *et al.*, 1995; BEKRIS, *et al.*, 2005; JIN *et al.*, 2019).

Uma exposição prolongada a eventos estressores resulta em alterações biológicas e químicas como aumento de oxidantes, ativação do SNA e do eixo HPA, liberação de citocinas pró-inflamatórias e redução das reservas de antioxidantes. Desse modo, estresse crônico e frustração crônica comumente induzem, em modelo animal, alterações neurobiológicas, as quais podem levar à depressão (WILLNER, 2005).

A adaptabilidade é um dos quesitos que devem ser considerados na aplicação do modelo. Estudos apontaram que a aplicação de um único tipo estressor de modo repetido desencadeia aumento de comportamento estressor seguido por adaptação. Mas, quando os animais são submetidos a estressores diferentes em momentos inesperados, cronicamente, cursaram com comportamento estressado contínuo e alta produção de corticosterona que gera toda cascata neuroinflamatória citada (PAGLIARONE *et al.*, 2016).

Desse modo, o modelo de depressão experimental compõe uma estratégia de estudo dos aspectos neurobiológicos da depressão e são capazes de elucidar comportamentos, vias neurais relacionadas ao transtorno, além de propiciar testes de novas alternativas terapêuticas e seus mecanismos de ação (WILLNER, 1997).

#### *1.3.3.2 Teste comportamental*

Como método comprobatório do estado de anedonia, em diversos estudos, foram realizados testes de comportamento, como o Teste de Preferência a Sacarose (TPS). Uma das características de indivíduo deprimido, avaliado nesse teste, é o seu desinteresse por atividades prazerosas, como o consumo de substâncias adocicadas. Animais anedônicos, assim como pessoas deprimidas, não tem esse prazer, logo não demonstram preferência entre

água ou sacarose. A similaridade do componente anedônico a esse estímulo torna o modelo de preferência por sacarose válido (WILLNER, 2005; PENG *et al.*, 2008; LIU *et al.*, 2014).

## 1.4 Possibilidades Terapêuticas

A partir das hipóteses apontadas, o sucesso da terapia antidepressiva estaria dependente da normalização dos processos inflamatórios e da regulação da sinalização monoaminérgica, entre outros fatores que são alterados no estado pró-inflamatório de estresse no cérebro (BORGES FILHO, 2014).

### 1.4.1 Eletroacupuntura

#### 1.4.1.1 Medicina Tradicional Chinesa (MTC): História da Acupuntura

A Medicina Tradicional Chinesa (MTC), se relaciona a um conjunto de práticas medicinais em uso na China que ultrapassam várias gerações. Seus relatos primordiais datam cerca de dois mil anos antes de Cristo. Contam como base dos seus princípios o equilíbrio da energia vital do corpo (*chi ou qi*) que se move pelo corpo através de canais, os meridianos, cujas ramificações conectariam aos órgãos (CHUNG *et al.*, 2007).

A base científica dessa medicina, foi desenvolvida a partir da medicina baseada em evidências. Ela mescla os princípios do yin/yang, da teoria dos cinco elementos e do sistema de circulação da energia pelos meridianos do corpo humano e a apresentações clínicas das afecções, tendo como base a fisiologia do organismo e sua interação com o ambiente (CHONGHUO, 1993).

É impossível, até então, determinar a data de surgimento da acupuntura. Alguns achados apontam o uso da técnica era praticada na China há mais de 5000 anos. Porém, o primeiro texto, propriamente dito, data entre 475 e 221 a.C., encontrado no Tratado de Medicina Interna do Imperador Amarelo (*Nei Jing*). Tornou-se famoso por trazer detalhes sobre a técnica e seus fundamentos. Foi dividido em dois volumes onde o primeiro é composto das técnicas de exame físico e os fundamentos da MTC, enquanto o segundo contém o diagnóstico e tratamento (HONG, 2005).

A acupuntura chegou a Europa por volta do século XVI e XVII através de missionários jesuítas vindos do Oriente. Em 1950 foram os primeiros passos do uso da acupuntura com base científica e integração com a medicina tradicional. Na década seguinte, já houveram pesquisas utilizando anestesia com acupuntura. Porém, 1970 trouxe retrocessos para seu uso, pois diante da explosão demográfica na China, foi autorizada a aplicação do

método por pessoas desqualificadas o que resultou em graves complicações, incluindo óbitos. Pouco tempo depois, o governo foi enfático em restringir seu uso aos médicos com formação especializada, o que permitiu um maior aprofundamento e sistematização do método (HONGHUO, 1993). E desde 1979, a Organização Mundial da Saúde (OMS) recomenda Acupuntura no tratamento de diversas condições clínicas (WHO, 2013).

Além da China, o Brasil é o único país do mundo, que conquistou três marcos fundamentais para a difusão do uso de acupuntura: a regulamentação como especialidade médica (1995); a implementação em um serviço público de saúde (1988); a obtenção de programa de residência médica de excelência (2002) (HONG, 2005; BRASIL, 2006; SOUSA *et al.*, 2017).

Atualmente, sendo realizados mais de 5 milhões de sessões de Acupuntura pelo Sistema Único de Saúde – SUS. Demonstrando ser uma terapêutica cada vez mais difundida e procurada pela população, devido ao alívio de uma série de sintomas, redução do uso de diversas medicações (como anti-inflamatórios), e consequente melhoria na qualidade de vida dos usuários (BRASIL, 2006; SOUSA *et al.*, 2017).

#### 1.4.1.2 Relação Fígado-Depressão

Para a MTC a etiologia dos transtornos mentais ocorre por meio de uma desregulação das sete emoções, que são alegria, raiva, preocupação, contemplação (pensamento), tristeza, medo e choque. O excesso de qualquer uma das emoções pode gerar mau funcionamento dos órgãos internos, resultando em transtorno mental. Por exemplo, raiva excessiva danifica o fígado, alegria excessiva danifica o coração, pensamento excessivo danifica o baço, dor excessiva danifica o pulmão e medo excessivo danifica o rim (JUNMEI *et al.*, 2012).

Além disso, cada órgão ainda tem categorias importantes que se correlacionam com cinco tipos de manifestação clínica da depressão: água, terra, fogo, metal e madeira. (MACIOCIA, 1996). A depressão do tipo madeira tem forte relação com manifestações clínicas hepáticas, e se relaciona um perfil de rotina exaustivo, onde o indivíduo diante de um fracasso subitamente perde a motivação, o sentido de viver (CHONGHUO, 1993).

O fígado, entre outros órgãos, tem forte relação com as atividades emocionais, para a MTC, destacando-se o humor, a depressão e a raiva. Logo, uma afecção do fígado geralmente é acompanhada de instabilidade emocional com depressão e irritação. Como um organismo cíclico, o inverso também é verdadeiro, uma depressão prolongada pode

enfraquecer o fígado, levando a distúrbios hepáticos e diminuição da resistência às infecções (MACIOCIA, 1996).

#### 1.4.1.3 Acupontos

Os atuais estudos fisiológicos da acupuntura sugerem que a acupuntura medeia sinais que controlam as informações através de uma rede de canais interconectados (meridianos), para restaurar a adaptabilidade e manter o equilíbrio (JUNMEI *et al.*, 2012).

Para anatomia o acuponto pode ser definido como um ponto, de aproximadamente 0,1-5 cm, com sensibilidade espontânea ao estímulo doloroso e/ou à resistência elétrica reduzida próximo, principalmente, a penetração das fibras nervosas na fáscia muscular, mas também nas articulações e bainhas tendíneas, vasos, nervos e septos intramusculares, na ligação músculo-tendínea, (TAFFAREL, 2009). Sendo localizados cerca de 309 pontos sobre terminações nervosas e 286 pontos localizados sobre os principais vasos sanguíneos, rodeados pelos *Nervi vasorum*, a inervação própria dos vasos sanguíneos (CHAN, 1984). Há ainda os pontos gatilhos (Trigger points, em inglês), são pontos de tensão localizados na musculatura, sensíveis ao toque e que condicionam o surgimento de sintomas à distância (HONG, 2005).

A punção de um acuponto gera um estímulo chamado *DeQi*, com sensação de parestesia elétrica ou calor. Nos animais essa sensação pode apresentar-se com um leve repuxo de pele ou tremor de cauda, associado a uma leve sonolência (HWANG; EGERBACHER, 2006).

Para MTC a intercepção entre os meridianos do fígado e do estado mental são os acupontos E36 (*Zusanli*) e VB34 (*Yanglingquan*). Sendo, respectivamente usado, para fortalecimento dos processos mentais (como na depressão), propiciando força e segurança para a liberação dos bloqueios emocionais (ROSS, 2003; JUNMEI *et al.* 2012) e o segundo correlaciona a deficiência do *xue* (sangue) do fígado e patologias hepáticas associado a episódios depressivos grave (COSTA; PEREIRA, 2012).

Yun-Kyoung *et al.* (2006) demonstraram que a aplicação da acupuntura manual no acuponto VB34 (*Yanglingquan*) reduz a toxicidade por tetracloreto de carbono (CCl<sub>4</sub>), protegendo o tecido hepático. O uso clínico desse acuponto também demonstrou benefícios para tratamento da icterícia, hepatite aguda, doenças biliares, cirrose do fígado e hipertensão (ROSS, 2003; JUNMEI *et al.* 2012).

#### 1.4.1.4 Neurofisiologia da acupuntura

Para entender algumas das ações da acupuntura no organismo, é importante destacar os mecanismos de modulação da dor. A teoria da comporta, é uma das teorias pioneiras, descrita por Melzack e Wall, em 1965, compreende o aumento do fluxo de impulsos nervosos das fibras periféricas pelo corpo posterior da substância cinzenta da medula espinhal através de fibras que agiram como uma comporta permitindo ou não a passagem do estímulo.

Essa teoria se baseava na ativação de neurônios sensitivos periféricos, das quais três tipos de fibras se destacam: a fibras tipo A, que possuem grande diâmetro, são mielinizadas e conseqüentemente conduzem impulsos nervosos com velocidades de 120 m/s. Podem ainda ser divididas em fibras alfa (aférente ou eférente), beta (aférente ou eférente), gama (eférente) e delta (aférente). As fibras tipo B, por sua vez, são mielinizadas, tem médio calibre e alcançam uma velocidade de 15m/s, além de conter neurônios motores e sensitivos do SNA. E, por fim, as fibras tipo C, que compõem mais de 50% das fibras sensoriais em boa parte dos nervos periféricos, são mais delgadas, não mielinizadas e conseqüentemente conduzem impulsos nervosos tão lentamente quanto 0,5 m/s (MELZACK; WALL *et al.*, 1965).

Na teoria da comporta os impulsos veiculados pelas fibras grossas (A) são responsáveis por fechar a comporta, ao passo que os impulsos das fibras de pequeno diâmetro (C) a abríam. Desse modo que a dor seria dependente da ação dominante das fibras C, que deixariam o estímulo passar, já analgesia seria responsabilidade das fibras A, que não deixariam a propagação do estímulo acontecer (GOLDSTEIN, 2009).

Baseado nessa teoria, propõem-se que os efeitos da Acupuntura ocorrem por meio de estímulos da rede neural periférica que alcançam o sistema nervoso central, por meio de neuromodulação ocorrendo em três níveis: local, espinhal ou segmentar, e supra-espinhal ou suprasegmentar. Essa neuromodulação, provoca, em termos gerais, além de liberação substâncias (principalmente neurotransmissores, como peptídeos opioides e monoaminas), modulam a via inibidora descendente da dor, além de atuar em funções motoras, sensoriais, autonômicas, neuroendócrinas e emocionais (HWANG *et al.*, 2006).

Assim a ação local da Acupuntura, ocorre por conta da lesão tecidual desencadeada pela inserção da agulha. Isso dispara estímulos nas terminações nervosas livres (dendritos das fibras nervosas A delta e C). E, também outras categorias de reações químicas como liberação de óxido nítrico, promovendo vasodilatação local e a melhora algica

decorrente do controle da isquemia; diminuição da liberação do fator de necrose tumoral (TNF) e outras substâncias pró-inflamatórias como substância P, degranulação de mastócitos e estimulação de secreção mucosa; aumento da liberação periférica de adenosina, substância oriunda da degradação do ATP e que possui efeitos analgésicos; Essas reações são descritas clinicamente como choque, sensação de peso ou parestesia (CHIANG *et al.*, 1973; MELSZACK *et al.*, 1977; WANG, 2008).

Ação segmentar da acupuntura é o conjunto de mecanismos fisiológicos que ocorrem do local do estímulo com agulha até a medula espinhal. O estímulo de fibras nervosas A delta, pela agulha de acupuntura, ativa o interneurônio inibitório, ou célula pedunculada, na lâmina II (que compõem a substância gelatinosa na subdivisão da matéria cinzenta) do corno posterior da medula espinhal. Essa é uma região rica em interneurônios produtores de neurotransmissores. Um dos mais importantes na ação inibitória da dor é o GABA e a encefalina. Esta, principalmente, atua tanto na lâmina II quanto na V, onde chega a fibras tipo "C" responsável pela dor crônica, com consequente minimização da sensação dolorosa (WANG, 2008).

Além disso, essa via (segmentar) ainda modula as ações da acupuntura nos fusos musculares, acionando fibras aferentes sensoriais que, ao serem conduzidas até a medula, estimulam reflexos miorreaxantes. Ao nível de ação suprasegmentar espinhal, a acupuntura é capaz de aliviar a dor em regiões distantes, supridas por nervos originados de segmentos totalmente diferentes. Envolve o tronco encefálico, o diencéfalo e o telencéfalo. E se desenvolvem por meio de alguns mecanismos como os suprasegmentar serotoninérgico e o noradrenérgico. Assim, contém os efeitos mais elaborados, sistêmicos e duradouros (GOLDSTEIN, 2009).

O mecanismo suprasegmentar serotoninérgico percorre o mesmo caminho das vias anteriormente citadas, até o ponto do corno posterior da medula, onde estímulo prossegue, atingindo o trato espinotalâmico lateral e é levado até o tálamo, no seu núcleo póstero-ventro lateral, aí o estímulo projeta-se para a zona somestésica primária do córtex cerebral onde são interpretadas, ou "percebidas" pelo córtex pré-frontal como sensação de parestesia que ocorrem durante o estímulo por acupuntura (YAMAMURA; NAKANO, 2010).

O córtex pré-frontal então envia fibras descendentes para a região arqueada do hipotálamo, que segue com o estímulo até a hipófise, onde há a dissipação dos efeitos da acupuntura para diversas outras glândulas do corpo, como as suprarrenais, a tireóide, os ovários, os testículos, entre outros. Seu efeito culmina com uma ação terapêutica sobre a

hipertensão arterial, taquicardia, sudorese, dismenorreia entre outras patologias (WEN, 1985; NATUME, 2017).

Mas os estímulos vão além, do hipotálamo descendem fibras contendo Beta-endorfina, para a substância cinzenta periaquedutal, onde inibe os neurônios inibitórios aí existentes, liberando o trajeto SCPA e Núcleo Magno da Rafe (NATUME, 2017).

A SCPA é a área mais eficaz de todo o sistema nervoso para abolição da dor por meio de microinjeções beta-endorfina um tipo de morfina endógena. Sistema, chamado de inibidor descendente da dor, que inclui o córtex pré-frontal, o núcleo arqueado do hipotálamo, a hipófise, a substância cinzenta periaquedutal, núcleos da rafe, os lócus cerúleos, núcleo paragigantocelular e outras estruturas superiores (NATUME, 2017).

Além de liberação de Beta-endorfina pelo hipotálamo e hipófise, ocorre também liberação do hormônio liberador de corticotrofina (CRH) hipotalâmico, que estimula a produção de hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) pela hipófise, enviado para a glândula suprarrenal, induzindo a produção de cortisol que, liberado na corrente sanguínea de modo pulsátil, será responsável por parte do efeito anti-inflamatório da acupuntura (ZHAO, 2008).

Do Núcleo Magno da Rafe, as fibras, cujo neurotransmissor é a serotonina, descem no funículo dorso lateral da medula espinhal para terminar diretamente nos neurônios encefalinérgicos da substância gelatinosa do corno dorsal da medula espinhal. Esse mecanismo explica os efeitos da Acupuntura não só no tratamento da dor, como também da depressão e dos estados de ansiedade (FILHO, 2014).

Na sequência, há ainda a produção de encefalina, na própria lâmina II e na lamina V, que atuam inibindo de forma pré e pós-sináptica o impulso nervoso das fibras C, o que acarreta em bloqueio do estímulo para o segundo neurônio da via da dor, minimizando, assim, a percepção da sensação dolorosa (SZABÓ, 2001).

No mecanismo suprasegmentar noradrenérgico, os neurônios noradrenérgicos descendentes oriundos do Lócus Cerúleos se projetam para o corno posterior da medula, onde inibem diretamente os neurônios espinais com os quais têm contato sináptico, minimizando a percepção da sensação dolorosa. Porém, essa via ainda não foi bem elucidada (NATUME, 2017).

Assim, alguns estudos ratificam os efeitos analgésicos, anti-inflamatórios, neuroregenerativos e neuroprotetores da acupuntura e os correlacionando como via de ação antidepressiva. Destacam ainda que a estimulação do ponto *Zusanli* (E36) seria capaz de promover a proliferação celular no giro denteado, reduzir a expressão de c-Fos (marcador neural de nociceção), diminuir a apoptose no hipocampo após isquemia e aumentar a

expressão de fatores neurotróficos no hipocampo de ratos submetidos ao estresse de imobilização (KIM *et al.*, 2003; JANG *et al.*, 2003; WANG *et al.*, 2008; TEIXEIRA, 2010; JUNMEI *et al.*, 2012).

Os efeitos antioxidantes, reforçados por alguns poucos estudos, também parece estar envolvido no mecanismo de ação da acupuntura. Liu e colaboradores (2006) observaram um importante aumento da atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD) e glutatona peroxidase (GSH-Px) em cérebros de ratos com infartos múltiplos (NATUME, 2017).

#### 1.4.1.5 *Características e aplicações da Eletroacupuntura*

A Eletroacupuntura (EAc) é composta pela passagem de uma corrente baixa intensidade e frequência variável o através dos tecidos do corpo por meio de agulhas de acupuntura com fins terapêuticos e analgésicos. A aplicação de corrente elétrica culminou na potencialização dos efeitos atribuídos a acupuntura como modulação antinoceptiva, antidepressivos, anti-inflamatório, antioxidantes e neuroproteção. A partir de então, a eletroacupuntura logo se propagou para o mundo. Atualmente, é uma das técnicas de maior relevância no tratamento de várias condições agudas e crônicas ligadas aos vários sistemas orgânicos (HAN CUI *et al.*, 2004; IN KOO HWANG *et al.*, 2010; YANG *et al.*, 2013).

Assim, alguns estudos começaram a demonstrar que o uso da eletroacupuntura parecia não só ser tão eficaz quanto a acupuntura, mas também potencializar seus efeitos. Dentre eles destacaram-se os efeitos antioxidantes, antinociceptivos, antidepressivos (WANG *et al.*, 2008; GU *et al.*, 2011; JUNMEI *et al.*, 2012).

Siu e colaboradores (2005) demonstraram o efeito antioxidante a partir da isquemia cerebral em ratos, onde houve com aumento da expressão de tioredoxina reduzindo as alterações oxidativas dos grupos tiol das proteínas lesionais. Silva *et al.* (2010) também trouxeram contribuições sobre a função antioxidativa, no qual uma única aplicação de EAc utilizando 100 Hz durante 30 minutos aumentou os níveis teciduais de GSH e reduziram o estresse oxidativo induzido por xilazina e quetamina no rim e no fígado de animais anestesiados (GU *et al.*, 2011).

Wang *et al.* (2008) e Zhao *et al.* (2008) ratificaram o efeito antinociceptivo local, por meio da estimulação com eletroacupuntura de baixas frequências, menores do que 5 Hz, que promoveu a liberação de metaencefalinas na medula espinal, com estimulação de fibras A $\delta$ .

Junmei e colaboradores (2012) trouxeram contribuições para o efeito antidepressivo da EAc como monoterapia para Transtorno depressivo maior teve efeitos comparáveis ao uso de amitriptilina além de obter menos efeitos colaterais. Jian Yang *et al.* (2013) evidenciaram, em estudos post-mortem mostraram que níveis de BDNF hipocampal são reduzidos em pacientes deprimidos. Quando comparado, em modelo animal, o tratamento antidepressivo e a EAc ambos regularam positivamente expressão de fator neurotrófico no hipocampo.

Eletroacupuntura é uma das terapias mais usadas no oriente para tratamento de distúrbios mentais. Acredita-se que a acupuntura seja uma alternativa eficaz de tratamento complementar em muitos distúrbios (YANG *et al.*, 2013).

## **1.4.2 Trans-Anetol**

### *1.4.2.1 Importância da pesquisa com produtos naturais*

O organismo humano, ao longo dos anos, passa por diversos processos fisiológicos ou patológicos que podem comprometer a capacidade de regeneração tecidual, anti-inflamatórios e antioxidante. Os usos dos fármacos atualmente empregados para auxiliar o corpo nesses processos estão associados a uma gama de efeitos colaterais que variam de indivíduo para indivíduo (VASCONCELOS *et al.*, 2014).

As plantas medicinais são frequentemente consideradas menos tóxicas e livres de efeitos colaterais que as drogas sintéticas. Além de ser uma recomendação da Organização Mundial da Saúde como alternativas terapêuticas, das quais inclui plantas medicinais como alvo, especialmente em países cujo acesso aos tratamentos convencionais parece inadequado (STADNICK, 2019).

Os principais extratos das plantas medicinais são os óleos essenciais (OEs). Para as plantas, esse componente tem uma importante função, pois são formados de elementos que ajudam na preservação de sua integridade seja por meio de sinalizadores químicos que atuam na proteção contra a perda de água e aumento da temperatura, seja por ação biológica antimicrobiana, antioxidante, antirradiação, entre outras (MAKKAR *et al.*, 2007; BAKKALI *et al.*, 2008; BAKKALI *et al.*, 2008; PRAGADHEESH, 2013; SANCHEZ-VIOQUE *et al.*, 2013; FONSÊCA, 2016).

Um dos principais elementos de sua composição são terpenos, seguidos dos fenilpropanoides. Eles que são responsáveis pelas principais ações biológicas. Além disso é composta por uma mistura de várias moléculas orgânicas, como hidrocarbonetos, álcoois,

ésteres, aldeídos, cetonas, fenóis, entre outras (BAKKALI *et al.*, 2008; KURKIN, 2003; ARAÚJO, 2018).

#### 1.4.2.2 *Características gerais e propriedades biológicas do Trans-anetol*

O Trans-anetol, parece ser uma dessas possibilidades de terapia alternativa para o tratamento de diversas doenças incluindo a depressão, pois representa um dos principais componentes do óleo essencial da planta *Croton zehntineri* (canela de cunhã), *Pimpinella anisum* (anis) e *Foeniculum vulgare* (erva-doce) encontradas em abundância principalmente em países de clima temperado e tropical (CARVALHO *et al.*, 2014; MORAIS, 2018).

Dentre sua apresentação química disponível na natureza o Trans-anetol (trans-1-metoxi-4-(1-propenil)-benzeno) é mais abundante e apresentou mais seguro para consumo. Para segurança de consumo e por ser uma substância que ocorre naturalmente em diversos alimentos como aromatizante, na fabricação de bebidas e em formulações farmacêuticas (LE BOURHIS; SOENEN, 1973; CIVO-TNO, 2000) em meados de 1965, o Trans-anetol começou a ser avaliado quanto a sua toxicidade pela FEMA (Flavor and Extracts Manufacturers Association) quando foi ratificado como substância segura, sendo inclusive eficiente detoxificação metabólica (NEWBERNE *et al.*, 1999).

Sua segurança também foi testada para uso em animais, e foi aceito que DL50 de 2.090 - 3.200 mg/kg de massa corporal por via oral e DL50 de 703-900 mg/kg por via intraperitoneal seria segura (CAUJOLLE; MEYNIER, 1958; JENNER *et al.*, 1964; BOISSIER; *et al.*, 1967; BORRISTON LABORATÓRIOS INC., 1984).

Quanto a farmacocinética, o Trans-anetol administrado por via oral é rapidamente absorvido. Tem metabolização hepática quase completa, com produção de metabólitos que são excretados prioritariamente pelos rins, podendo ser excretados também pelo pulmão (FRITSCH *et al.*, 1975; LE BOURHIS, 1968; SOLHEIM; SCHELIN, 1976).

Além de segurança alimentar e de sua baixa toxicidade, o Trans-anetol possui muitas atividades biológicas tais como: atividade antitumoral (ITOIGAWA *et al.*, 2004; CHAINY *et al.*, 2000; FRREIRE *et al.*, 2005), anti-inflamatória (KORKINA *et al.*, 2011; PONTE *et al.*, 2015; KANG *et al.*, 2013; MORADI *et al.*, 2014; RITTER *et al.*, 2013; MORAIS, 2018), antioxidante (KORKINA *et al.*, 2007; FREIRE *et al.*, 2005), efeitos anticonvulsivante, analgésico, hipnótico, ansiolítico (MIYAGAWA *et al.*, 2014), entre outras.

#### 1.4.2.3 Atividade anti-inflamatória do Trans-anetol

Como abordado em estudos anteriores uma das principais ações do Trans-anetol seria a modulação da inflamação e dos processos oxidativos, podendo ainda ter correlação dessas ações com efeito antidepressivo (ARAÚJO, 2018).

Desse modo, alguns desses estudos apontam que esse mecanismo ocorre por meio de redução de processo inflamatório local, onde o Trans-anetol reduz o aumento permeabilidade vascular, e conseqüentemente diminui a migração de macrófagos e neutrófilos, além de reduzir de TNF- $\alpha$ , IL6 e IL1 $\beta$ , óxido nítrico, a expressão de MMP-9. Além disso, inibe a ativação de NF- $\kappa$ B, bloqueando a degradação de ator nuclear do intensificador do gene do polipeptídeo kappa leve no inibidor de células B (PONTE, 2015; KANG *et al.*, 2013).

Além disso, o Trans-anetol também demonstrou atividade antinociceptiva, antioxidante e imunomoduladora da cicatrização. Em alguns modelos com hipernocicepção mecânica induzida por carragenina, houve redução da produção de mieloperoxidase, TNF- $\alpha$ , IL-1 e IL-17 na pata afetada (RITTER *et al.*, 2014). Sobre os radicais livre houve aumento da atividade de antioxidantes primários como a superóxido dismutase (SOD), a Catalase (CAT), glutathione-S-transferase (GST) e a GSH (KHAN *et al.*, 2011), atuando também sobre a peroxidação lipídica (MORAIS, 2018). E sobre o processo de cicatrização houve aumento de fibroblastos e de fibras de colágeno no local da lesão (GAGAN *et al.*, 2000; WIIZLER *et al.*, 2015; CAVALCANTI *et al.*, 2012).

#### 1.4.2.4 Atividade do Trans-anetol na resposta ao estresse e a depressão

O principal mecanismo de ação sobre a depressão parece se relacionar com o estresse oxidativo. Drukarch *et al.* (2006), por exemplo, relatou que o Trans-anetol tinha potencial de inibir particularmente a atividade da monoamina enzima oxidase B (MAO-B) uma enzima responsável por catalisar a desaminação oxidativa das aminas neuroativas. Essa inibição se faz importante, pois o aumento do catabolismo de monoaminas pela MAO está envolvida no aumento da geração dos radicais livres levando ao aumento do estresse oxidativo que pode piorar ainda mais as doenças psiquiátricas.

Portanto o Trans-anetol, sendo o antioxidante e o inibidor da MAO-B, pode estar envolvido na diminuição dos comportamentos depressogênico e ansiogênico aumentando a disponibilidade de 5-HT para seus receptores na sinapse (PERVEEN *et al.*, 2017).

Além disso, outros estudos, apontam que a suplementação com Trans-anetol proporcionou um aumento dos níveis de superóxido dismutase, glutathione peroxidase, glutathione-*S*-transferase, glutathione reductase e catalase, e os níveis de malondialdeído e óxido nítrico aumentaram nas áreas do córtex cerebral e hipocampo em modelo animal submetido a estresse leve moderado (EL-SHAMY *et al.*, 2019).

### **1.5 Relevância e justificativa**

Assim, a depressão é um transtorno crônico e recorrente, que afeta a vida de muitos indivíduos, cuja fisiopatologia não está totalmente esclarecida, podendo desencadear reações complexas de inflamação e oxidação levando a efeitos deletérios em diversos órgãos. Isso acarreta na carência de medicamentos ideais para o seu tratamento, uma vez que, os fármacos utilizados na atualidade apresentam um início de ação lento e muitos eventos adversos, somado ao problema de que uma grande parcela dos pacientes não responde bem à terapia com antidepressivos (NESTLER *et al.*, 2002; BERLIM; TURECKI, 2007).

Sendo assim, o desenvolvimento de possibilidades terapêuticas sustentáveis, de mais fácil acesso e com menos efeitos adversos teria um impacto substancial tanto para o paciente quanto para a saúde pública em geral (ARAÚJO, 2018).

Como alternativa terapêutica, de um lado, conta-se com hábitos do uso de algum tipo de plantas medicinais, como a erva-doce, porém sem saber suas reais benesses. De outro, conta-se terapia milenar, que já se mostrou segura, livre de efeitos adverso, como a eletroacupuntura. Em ambas as terapias, isoladamente, por mecanismos distintos, tem-se demonstrado atividades anti-inflamatória, antioxidante, antidepressiva, entre outros efeitos cada vez mais fundamentados (TRIVEDI *et al.*, 2006).

Diante disso, os possíveis benefícios dessas duas terapias combinadas parecem ser uma alternativa inovadora sobre a proteção contra o estresse oxidativo e a inflamação, e conseqüentemente contra a depressão. Testar essas terapias em animais submetidos a um modelo experimental de depressão por Estresse Crônico Moderado e Imprevisível (EMCI), simulando situações de estresse do cotidiano, e avaliar os efeitos sistêmicos e locais, como no fígado garante o ineditismo dessa pesquisa.

## **2 OBJETIVO**

### **2.1. Objetivo Geral**

Avaliar o efeito da Eletroacupuntura (100Hz) e do Trans-anetol como adjuvante na redução do estresse oxidativo induzido por Estresse Crônico Moderado e Imprevisível (ECMI) medidas por parâmetros hematológicos e hepáticos de ratos.

### **2.2. Objetivo Específico**

- Averiguar a instauração de Estresse Crônico Moderado Imprevisível por meio do Teste de Preferência a Sacarose;
- Avaliar a variação de peso ao longo das etapas estressora, pré-tratamento e pós-tratamento;
- Investigar a participação da Eletroacupuntura (100Hz) e do Trans-anetol na modulação da inflamação e oxidação;

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Animais

Foram utilizados 42 ratos, machos (*Rattus norvegicus: var.albinus*, *Rodentia*, *Mammalia*), com peso variando de 100 a 300g, da linhagem *Wistar*, saudáveis e bem nutridos, provenientes do o Biotério da Unichristus em parceria com Biotério Central da Universidade Federal do Ceará (UFC), criados e mantidos sob condições ambientais e alimentares semelhantes.

Os animais ficaram hospedados em gaiolas de polipropileno, providas de tampa com grade metálica de aço inoxidável e forradas com maravalhas, alojadas em dependências refrigeradas ( $24\pm 2^{\circ}\text{C}$ ). Com alternância dos ciclos claro/escuro a cada 12 horas. Água potável e ração comercial para ratos (Nuvilab CR-1®, Irradiada, QUIMTIA S.A., Canguiri, Colombo, Paraná) foram ofertadas ad libitum até 12 horas antes do experimento.

Quanto a manutenção do ambiente dos animais houve higienização das gaiolas duas vezes por semana. As condições de saúde dos animais foram averiguadas diariamente pelos técnicos responsáveis. Os procedimentos foram realizados em ambiente refrigerado, no Biotério da Unichristus.

O estudo foi previamente submetido ao Comitê de Ética e Pesquisa Animal (CEPA), do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará (UFC) para uso de animais experimentais sob o n° 21/2016 (APÊNDICE A). Foram observados os Princípios Éticos na Experimentação Animal, obedecendo as Resolução Normativa 12/2013 do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

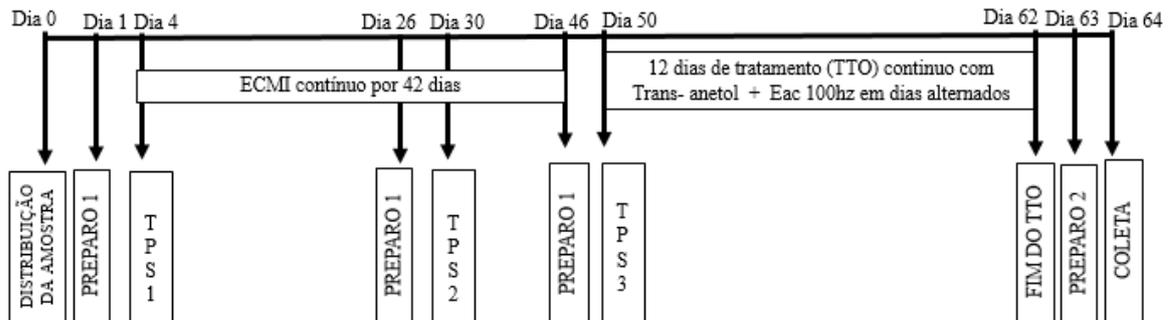
#### 3.2 Drogas e reagentes

Teste comportamental: Sacarose 1% (Sigma E.U.A); Para o tratamento: Trans-anetol, tween 80 (polioxietileno sorbitano monoelato), salina, água destilada. Para a coleta: EDTA ou heparina, Quetamina, Xilazina. Para o processamento de MPO: Polytron® PT,  $\text{Na}_3\text{PO}_4$ , terametilbenzidino. Para processamento do GSH: TRIS HCL, reagente de Ellman (ácido 5,5'-ditiobis- (ácido 2-nitrobenzóico) ou DTNB, ácido tiobarbitúrico da Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA). Para processamento do TGO/TGP: Kits Biocontrol N e P Bioclin, cloreto de sódio 0,9%. Para processamento do MDA/TBARS: ácido fosfórico ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ , 1%), N-butanol.

### 3.3 Delineamento experimental

O delineamento da pesquisa consiste em cinco etapas: distribuição da amostra, aplicação do estressor, comprovação do estresse, aplicação do tratamento e coleta, como pode ser visualizado na Figura 2.

Figura 2 - Delineamento do experimento



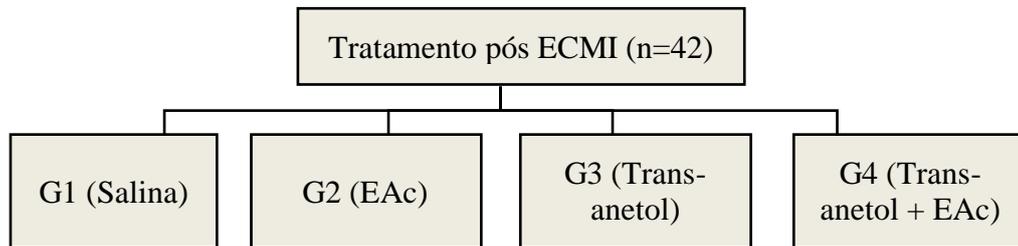
Fonte: Dados da pesquisa. Legenda: ECMI: Estresse Crônico Moderado Imprevisível; Preparo 1: 48 horas exposto a sacarose e 23 horas de jejum; Preparo 2: 24 horas de jejum para coleta; TPS: Teste de Preferência a Sacarose; EAc: Eletroacupuntura 100Hz.

### 3.4 Distribuição da amostra

Os grupos eram compostos por quarenta e dois (42) ratos, randomizados em quatro grupos, respeitando a variação de peso, a fim de evitar ataques por dominância de território. Os grupos de continham 10 - 11 animais distribuídos em caixas de 5 - 6 animais, assim denominados: G1 – Salina, G2 - EAc (Eletroacupuntura 100 Hz), G3– Trans-anetol, G4 – EAc + Trans-anetol. A figura 3 mostra o desenho do experimento.

Para melhor compreensão do desenho experimental, optou-se por realizar um grupo controle negativo, o qual recebeu todos os estressores que os demais grupos, mas não foi submetido a tratamentos já comprovados na literatura.

Figura 3 - Identificação dos grupos de animais submetidos ao tratamento pós estresse crônico moderado e imprevisível (ECMI)



Fonte: Dados da pesquisa.

### 3.5 Estresse Crônico Moderado e Imprevisível

O quadro depressivo é induzido utilizando-se um protocolo validado por diversos estudos disponíveis na literatura médica (WILLNER *et al.*, 1987; WILLNER *et al.*, 1992; MATTHEWS *et al.*, 1995; FORBES *et al.*, 1996; KONKLE, *et al.*, 2003; BEKRIS *et al.*, 2005; WILLNER, 2005; JIN *et al.*, 2019) denominado Estresse Crônico Moderado e Imprevisível (ECMI) onde os animais são expostos a um evento estressante inescapável e o comportamento deste animal frente a esse evento é avaliado (FILHO, 2014).

O protocolo aplicado é uma versão modificada englobando características dos diversos estudos citados, e consistiu na aplicação de cinco tipos de estressores moderados e imprevisíveis (Tabela 1), de modo contínuo e alternado, durante 6 semanas (42 dias). A cada mudança de estressor, o estímulo aplicado anteriormente é retirado. A aplicação dos estressores seguiu um padrão randômico, para evitar que os animais fossem submetidos aos estressores em dias predeterminados, evitando o aprendizado.

Tabela 1 – Descrição dos estressores aplicado no protocolo de ECMI

<b>Estressor</b>	<b>Características</b>	<b>Tempo</b>
Espaço restrito	Disposição de um grupo de ratos em gaiolas previstas para camundongos.	2 horas
Inclinação da gaiola	Posicionamento da gaiola entre 30°-45°	4 horas
Habitação úmida	Aplicação de aproximadamente 500 ml de água sobre a maravalha onde os animais estão alojados.	8 horas
Privação de alimentos	Retirada da ração.	19 horas, 24 horas e 43 horas
Jejum hídrico	Retirada da garrafa de água.	17 horas, 19 horas e 20 horas

Fonte: Dados da pesquisa.

### 3.6 Teste de Preferência a Sacarose

O TPS foi realizado em três momentos diferentes intervalos de tempo: TPS1, realizado antes do início do ECMI, TPS2, na 5ª semana do ECMI, no 30º dia do experimento, TPS3, após ECMI (no 48º dia do experimento). Em cada etapa do TPS, os animais tiveram um preparo de 48 horas de exposição a 2 garrafas, uma contendo água e outra sacarose, para evitar um processo aversivo e garantir a palatabilidade da substância nova. As garrafas foram colocadas em posições inversas ao teste para evitar o aprendizado. Antes do teste os animais foram colocados em jejum total por 23 horas. Seguido de oferta de água potável e solução de sacarose a 1% em recipientes contendo respectivamente 100ml de solução de sacarose ou água potável, durante 1 h. Após conclusão dos testes os animais tiveram acesso à água e ração ad libitum. Para cálculo do consumo a utilizou-se a fórmula (PAOLO *et al.*, 1994; BEKRIS *et al.*, 2005; CHANDRASEKHAR, Y. *et al.* 2017; BURAN *et al.* 2017):

$$PS = \frac{IS (g)}{(IS + IA)g} \times 100$$

Onde:

PS = Preferência a Sacarose

IS = ingestão de solução de sacarose a 1% (g)

IA = Ingestão de água potável

### 3.7 Eletroacupuntura

#### 3.7.1 Condicionamento dos ratos

Para realizar os procedimentos de EAc sem a utilização de anestésicos, os animais foram colocados em dispositivos de contenção semelhantes as redes, com aberturas para a saída dos membros, suspensas em um arco metálico confeccionado para tal finalidade (Figura 4). Os animais passaram por períodos de aclimatação progressivos (5, 7 e 15 minutos), durante três dias consecutivos anteriormente ao tratamento com Eletroacupuntura e administração do Trans-anetol. Durante os seis dias intercalados de tratamento com os grupos G1, G2, G3 e G4, os animais ficaram acondicionado por 15 minutos. A falta de apoio para as patas foi essencial para a cessação da locomoção.

Figura 4 - Rato posicionado na rede, para aclimatação (preparação para as sessões Eletroacupuntura).



Fonte: Dados da pesquisa.

#### 3.7.2 Localização dos pontos e protocolo de aplicação da Eletroacupuntura

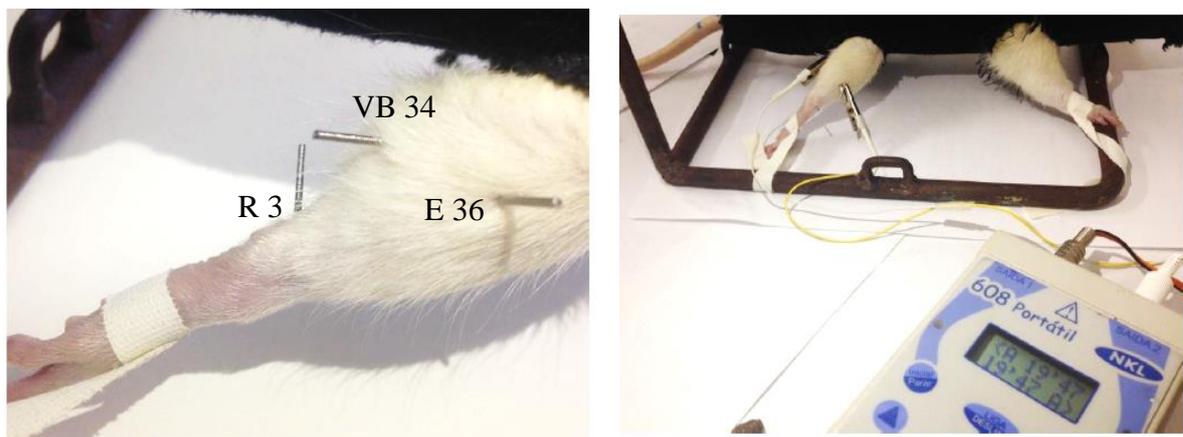
Para a realização da Eletroacupuntura são usadas agulhas metálicas de aço inoxidável, descartáveis, de 0,18 mm de diâmetro / 8 mm de comprimento (modelo DCB 132, fabricadas na China e distribuídas no Brasil por Dong Bang Produtos de Acupuntura - EPP, São Caetano do Sul – SP) inseridas no membro pélvico direito, em três pontos.

As posições dos diversos acupontos propostos para o ser humano tem em interseção semelhantes estruturas anatômicas nos animais vertebrados. São um total de 121 acupontos, no qual o acuponto *Zusanli* (E-36) se localiza, no roedor, 5 mm abaixo da cabeça fibular e 2 mm lateral ao tubérculo anterior da fíbula, por onde passam ramos laterais do nervo sural cutâneo, o ramo cutâneo do nervo safeno e o ramo profundo do nervo peroneal. O VB34 se localiza, na depressão anterior e inferior da cabeça fibular; onde passam os ramos laterais do nervo sural cutâneo e o e o ramo profundo do nervo fibular (PANZER, 1993; MARTINS; GARCIA, 2003; SANTOS, 2013).

Os pontos escolhidos foram: no ponto *Zusanli* (E-36) e nos pontos *Yanglingquan* (VB-34) e *Taixi* (R-3), sendo este último um ponto de controle da tensão elétrica para esta pesquisa (Figura 5). As agulhas foram retiradas após 15 minutos. Este procedimento foi repetido no mesmo horário (no período da manhã), em dias alternados, perfazendo um total de seis aplicações.

Nos ratos tratados com EAc (G2 e G4), após introdução das agulhas nos acupontos E36 e VB34, eletrodos com garras tipo jacaré foram conectados às agulhas de acupuntura. Foi aplicada uma corrente elétrica com intensidade de 1,0 mA e 100 Hz de frequência, pulsos quadrados de 2 segundos, ondas tipo Burst, com intervalo (repouso) de 2 segundos. O estímulo elétrico foi mantido por 15 minutos, utilizando o eletroestimulador modelo 608 Fix portátil (NKL Produtos Eletrônicos, Brusque, Santa Catarina, Brasil), previamente calibrado pelo fabricante.

Figura 5 - Rato posicionado na rede com agulhas inseridas nos pontos de realização da eletroacupuntura (Esquerda) e Eletrodos conectado a ponto VB34 e E36 (Direita).



Fonte: Dados da pesquisa.

### **3.8 Administração de Trans-anetol**

Os animais do grupo G1 receberam salina 1,0 mg/kg durante 12 dias, diariamente, após o ECMI, por gavagem. Os animais dos grupos G2 e G4 receberam tratamento com Trans-anetol 1,0 mg/kg/dia por gavagem, exclusivamente, após o ECMI, ou como terapia adjuvada de Eletroacupuntura 100Hz, durante 12 dias. As doses e a duração dos tratamentos levaram em consideração o trabalho de Lima (2012) para Trans-anetol.

### **3.9 Coleta das amostras e avaliação bioquímica**

#### ***3.9.1 Procedimento anestésico para coleta***

A anestesia, utilizada para a coleta de amostras, foi obtida, por via intraperitoneal (IP) de uma solução anestésica, pela aplicação de cloridrato de Quetamina 90 mg/Kg + Xilazina 10 mg/Kg.

#### ***3.9.2 Coleta e amostras***

Vinte e quatro horas após o término dos experimentos os animais foram anestesiados para coleta de sangue arterial por punção da aorta abdominal e do lobo esquerdo fígado. Terminada a coleta, os animais, ainda sob efeito anestésico, foram eutanasiados utilizando técnica de deslocamento cervical e guilhotina.

O sangue arterial coletado por punção da aorta abdominal e centrifugado (2500 rpm /15 min); o soro obtido e armazenado em temperatura de -70° para posterior análise de parâmetros bioquímicos (TGO, TGP, malonaldeído (MDA), TBARS, glutathiona reduzida (GSH).

O lóbulo esquerdo foi fragmentado (cerca de 200 mg de tecido hepático) foi utilizado para a dosagem de mieloperoxidase (MPO). O restante do fígado foi homogeneizado em tampão de fosfato de sódio 0,05 M (pH 7,0), centrifugado a 700 rotações /min durante 10 minutos a 4 ° C e o sobrenadante foi utilizado para a dosagem de MDA e de GSH.

### ***3.9.3 Avaliação da peroxidação lipídica e quantificação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico - TBARS***

O procedimento acontece pela extração deste composto usando um solvente orgânico (n-butanol), este método avalia o estresse oxidativo testado para o malondialdeído, o último produto da quebra lipídica, causada pelo estresse oxidativo, determinando-se a concentração de MDA que é capaz de reagir, sob aquecimento em meio ácido (ácido tiobarbitúrico), originando um composto de cor rosa. A concentração de MDA pode ser expressa por meio das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).

As amostras dos tecidos (fígado), foram lavadas com soro fisiológico gelado (4° C) para remover quaisquer vestígios de sangue, pesadas e estocadas a -70°C imediatamente após a coleta. Posteriormente, a amostra de tecido foi homogeneizada em cloreto de potássio gelado 1,15%, resultando em uma solução ácida com concentração a 10%. Retirou-se uma alíquota de 0,5 ml de cada amostra e acrescentou-se 1,0 ml da solução aquosa de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico a 0,6% e 3,0 ml da solução de ácido fosfórico (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 1%).

A mistura foi colocada em banho fervente por 45 minutos, resfriada em banho de gelo seguido da adição de 4,0 ml de N-butanol. Após 2,0 minutos de agitação a mistura foi centrifugada por 10 minutos a 3.000 r.p.m. A absorbância da camada orgânica sobrenadante (fase butanólica) foi medida a 520 nm e 535 nm em espectrofotômetro de ultra-violeta visível, marca VANKEL 50 UV-VIS (Varian Indústria e Comércio Ltda, São Paulo, SP). A diferença entre os valores obtidos nas duas leituras foi utilizada para calcular a concentração de MDA, usando a regressão linear a partir de uma curva padrão.

### ***3.9.4 Determinação de grupos sulfidrílicos não protéicos (Glutathiona-GSH)***

A determinação dos grupos GSH foi realizada pelo Método de Sedlak e Lindsay (1968), baseado na reação do 5,5'-ditiobis (2-ácidonitrozenzóico) (DTNB – reagente de Ellman) 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 em espectrofotômetro (Beckman DU-640, Fullerton, Califórnia).

A amostra de tecido (200 mg) foi pesada e homogeneizada em 5 ml de EDTA 0,02M gelado, com bastão de vidro e filtrado em lã de vidro. Retiram-se 4,0 ml do homogenato e mistura-se com 3,2 ml de água destilada e 0,8 ml de ácido tricloroacético 50%. O tubo é agitado e centrifugado a 3000 g por 15 minutos. Retiram-se 2,0 ml do sobrenadante e acrescenta-se 4 ml de TRIS 0,4 M (pH 8,9) e 0,1 ml de DTNB 0,01 M; agita-se a mistura

para homogeneização. Em seguida, lê-se as absorvâncias no espectrofotômetro à 412nm, 5 minutos após a adição do DTNB. A concentração final de GSH foi obtida comparando-se o valor da absorvância com uma tabela padrão de GSH, previamente preparada.

### **3.9.5 Mensuração da atividade da Mieloperoxidase (MPO)**

Após coleta, a amostra foi pesada e acondicionada em *ependorf* com tampão gelado (NaCl 0,1 M, NaPO<sub>4</sub> 0,02 M, Na EDTA 0,015 M, pH 4,7). O tecido foi homogeneizado em Polytron® PT 3100 a 13000 rpm. No pellet foi feita lise hipotônica com solução de NaCl 0,2% e após 30 segundos adição de NaCl 1,6% com glicose 5%. Após centrifugação, o *pellet* foi ressuscendido em tampão NaPO<sub>4</sub> 0,05 M (pH 5,4) contendo 0,5% brometo de hexadeciltrimetilamônio e rehomegeneizado.

Após centrifugação a 13000 rpm, 5 mL do sobrenadante foram utilizados para a dosagem em placas de 96 poços diluído em 45 mL de NaPO<sub>4</sub> 0,08 M. A atividade da mieloperoxidase no sobrenadante foi dosada usando tetrametilbenzidina 1,6 mM e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,5 mM) e lida no leitor de placas de 96 poços à 450 nm. As concentrações de MPO foram expressas em unidade mg/dl de tecido.

### **3.9.6 Mensuração da atividade da Transaminase glutâmico pirúvico (TGP) e da Transaminase glutâmico oxalácetico (TGO)**

O soro ou plasma é colhido com ácido etilenodiamino tetra-acético ou heparina, obtido livre de hemólise. O uso de kits Biocontrol N e P Bioclin. L foi usado para o processamento da Amostra. Foi usado 1,0 mL do reagente, seguido de transferência para cubeta termostaticada à 37°C e espera 1 minuto. Realizado a leitura inicial, disparando simultaneamente o cronômetro. Repetiu-se as leituras após 1, 2 e 3 minutos. Foi calculado a média das diferenças de absorvância por minuto (A/min.). No caso de uma variação média na absorvância 0,080 em 365 nm, repetir a determinação, diluindo 334 nm ou a amostra com NaCl 0,85%. Multiplicar o resultado obtido pelo fator de diluição.

A amostra continha soro e foi utilizado kits Biocontrol N e P Bioclin. com 1,0 mL do reagente. A amostra foi transferida para cubeta termostaticada à 37°C e esperou-se 1 minuto. Foi repetido as leituras após 1, 2 e 3 minutos e calculado a média das diferenças de absorvância por minuto (A/min.).

### **3.10 Riscos e Benefícios da pesquisa**

Os riscos envolvendo os pesquisadores que manipulavam os animais englobaram a exposição ao material biológico (excretas e saliva) e risco de acidente (mordida, arranhadura e outros).

Os benefícios da pesquisa em modelo experimental “*in vivo*” são aplicação de estressores e tratamento em ambiente controlado, respostas fisiológicas imediatas, mecanismos comparáveis com o ser humano.

### **3.11 Análise Estatística**

Os dados descritivos da eficácia do tratamento com Trans-Anetol, EAc 100 Hz e a associação de Trans-anetol com EAc 100Hz nos momentos após ECMI foram apresentados como média  $\pm$  EPM. Para verificação de significância estatística foram utilizados os testes Anova One-way e teste não-paramétrico Kruskal-Wallis, quando significativos realizou-se testes post-hoc através dos testes Tukey e Dunn's, respectivamente. Os resultados foram considerados significantes para  $p < 0,05$ . Os dados do estudo foram analisados no software Graphpad Prism versão 5.0 para Windows, *GraphPad Software, San Diego, California, U.S.A.*

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Variação do peso dos animais durante o experimento

Todos os grupos foram comparados entre si e o porcentual foi calculado de acordo com a perda ou ganho de peso comparando com o período anterior. Desse modo, no Período de Pré-tratamento houve redução de peso dos grupos 3 e 4 e redução de ganho de peso dos grupos 1 e 2 quando comparado ao Período Estressor, configurando que o ECMI teve efeito negativo de 39,6% sobre o ganho de peso dos animais de modo geral (Tabela 2) quando comparado com animais que não sofrem estresse crônico segundo Tomanari *et al.* (2003).

Tabela 2 - Variação percentual do peso médio dos ratos nos períodos estressor, pré-tratamento e pós-tratamento de acordo com os grupos.

<b>Grupo</b>	<b>Estressor</b>	<b>Pré-tratamento</b>	<b>Pós-Tratamento</b>
G1	37,7%	17,3%	27,0%
G2	9,9%	9,9%	20,9%
G3	0,5%	-6,7%	20,2%
G4	-3,6%	-3,3%	13,4%

Fonte: Dados da pesquisa.

Já após no Período Pós-Tratamento percebeu-se um acréscimo médio de 19,2% do peso quando comparado ao Período de Pré-tratamento, evidenciando um efeito positivo dos tratamentos sobre o peso em todos os grupos.

### 4.2 Avaliação do Estresse Crônico Moderado e Imprevisível pelo Teste de Preferência a Sacarose

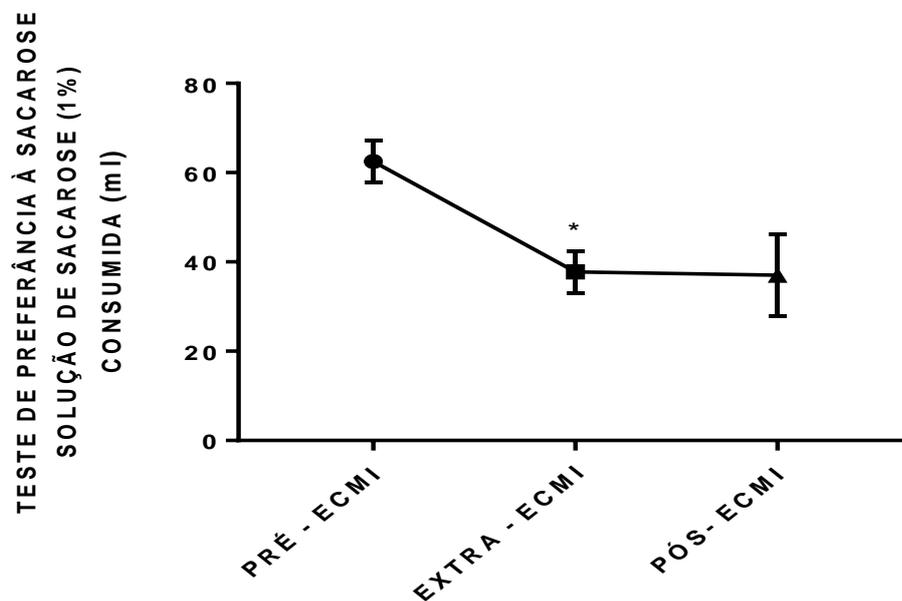
Quanto ao Teste de Preferência a Sacarose houve redução, significativa, de 60% da quantidade de sacarose consumida no teste Pré-ECM em relação a avaliação do Meio-ECM (Média  $\pm$  EPM; Meio-ECM:  $37,75 \pm 4,77$  vs Pré-ECMI:  $62,50 \pm 4,65$ g/mL), parâmetro que se manteve após aplicação dos 42 dias de estressor ( $37,00 \pm 9,16$  g/mL).

Tabela 3- Análise do Teste de Preferência à Sacarose (TPS) em ratos

Grupo	Sacarose
Pré - ECMI	62,50 ± 4,65
Meio – ECMI*	37,75 ± 4,77
Pós - ECMI	37,00 ± 9,16

Fonte: Dados da pesquisa. Os animais foram submetidos ao Teste de Preferência à Sacarose (TPS) em três momentos do experimento; PRÉ-ECMI – antes de iniciar o protocolo de estresse crônico moderado; MEIO-ECMI – durante o protocolo de estresse crônico moderado; PÓS-ECMI – após protocolo de estresse crônico moderado. Os valores são expressos em média ± EPM, (n = 42). \* < 0,05, em relação ao PRÉ-ECMI (Teste de Kruskal-Wallis- Teste não paramétrico < 0,05 com testes de comparação múltipla via Dunn's).

Figura 6 – Análise do Teste de Preferência à Sacarose (TPS) em ratos



Fonte: Dados da pesquisa. Os animais foram submetidos ao Teste de Preferência à Sacarose (TPS) em três momentos do experimento; PRÉ-ECMI – antes de iniciar o protocolo de estresse crônico moderado; MEIO-ECMI – durante o protocolo de estresse crônico moderado; PÓS-ECMI – após protocolo de estresse crônico moderado. Os valores são expressos em média ± EPM, (n = 42). \* < 0,05, em relação ao PRÉ-ECMI (Teste de Kruskal-Wallis- Teste não paramétrico < 0,05 com testes de comparação múltipla via Dunn's).

### 4.3 Efeitos eletroacupuntura (100 Hz) e/ou do Trans-Anetol sobre os parâmetros bioquímicos

#### 4.3.1 A Eletroacupuntura e/ou Trans-anetol não alteram as dosagens de TGO e TGP em animais submetidos ao ECMI

Em relação ao TGO, houve aumento de 26,39% ( $99,70 \pm 6,71$ U/L) em seu valor sérico no grupo G2 – Eletroacupuntura e de 4,58% no grupo G3 – Trans-anetol ( $82,50 \pm 9,86$ ) quando comparado ao grupo G1 - Salina ( $78,88 \pm 4,34$  U/L). No entanto, o grupo tratado com Eletroacupuntura + Trans-anetol apresentou uma redução de 32,46% em relação ao grupo Salina (Média  $\pm$  EPM; G4:  $53,27 \pm 7,73$  vs G1:  $78,89 \pm 4,34$  U/L) ( $53,27 \pm 7,73$ U/L), porém, sem significância estatística (Tabela 4, Figura 7).

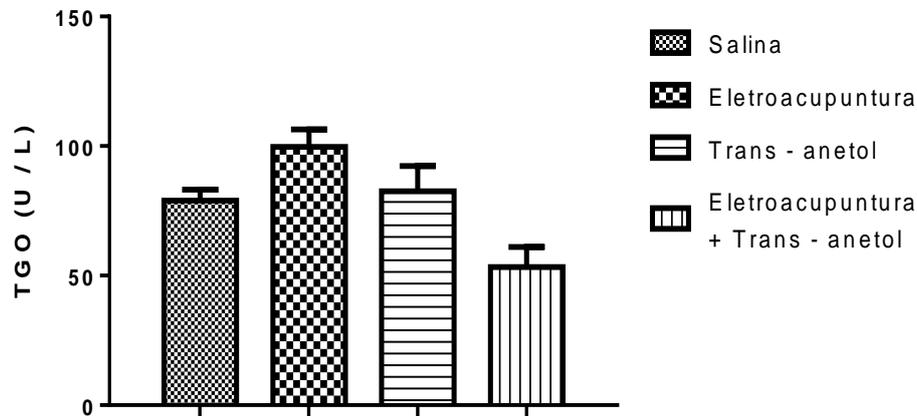
Quanto à dosagem de TGP no plasma, o mesmo padrão de aumento nos grupos G2 – Eletroacupuntura ( $55,30 \pm 3,17$ U/L) e G3 – Trans-Anetol ( $60,00 \pm 4,23$ U/L) é evidenciado, apresentando um acréscimo de 5,01% e 13,93%, respectivamente, em relação ao grupo G1 – Salina ( $52,66 \pm 3,03$ U/L). Entretanto, a redução dos níveis de TGP no grupo G4 – Eletroacupuntura + Trans-anetol ( $45,09 \pm 4,09$ U/L) também seguiu o padrão apresentado pelos níveis de TGO plasmático, com redução de 14,37% (Tabela 5, Figura 8).

Tabela 4 - Efeitos da Eletroacupuntura (100 Hz) e/ou do Trans-anetol em ratos submetidos a Estresse Crônico Moderado Imprevisível (ECMI) sobre as concentrações de TGO plasmáticos.

Grupo	TGO (U / L)
Grupos 1 - Salina	$78,89 \pm 4,34$
Grupo 2 - Eletroacupuntura	$99,70 \pm 6,71$
Grupo 3 - Trans - Anetol	$82,50 \pm 9,87$
Grupo 4 - Eletroacupuntura + Trans-Anetol	$53,27 \pm 7,73$

Fonte: Dados da pesquisa. Os valores são expressos em média  $\pm$  EPM, (n = 9 - 11). One way ANOVA - Tukey Multiple Comparison Test, sem significância estatística.

Figura 7 - Efeitos da Eletroacupuntura (100 Hz) e/ou do Trans-anetol em ratos submetidos a Estresse Crônico Moderado Imprevisível (ECMI) sobre as concentrações de TGO plasmáticos.



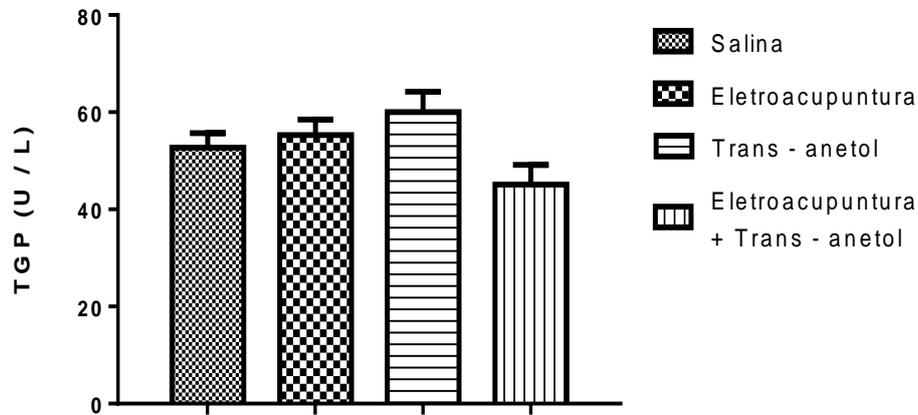
Fonte: Dados da pesquisa. Os animais foram submetidos ao protocolo de Estresse Crônico Moderado e, posteriormente, tratados com Salina (G1), Eletroacupuntura (G2), Trans-anetol (G3) e Eletroacupuntura + Trans - Anetol (G4). Os valores são expressos em média  $\pm$  EPM, (n = 9 - 11). One way ANOVA - Tukey Multiple Comparison Test, sem significância estatística.

Tabela 5 - Efeitos da Eletroacupuntura (100 Hz) e/ou do Trans-anetol em ratos submetidos a Estresse Crônico Moderado Imprevisível (ECMI) sobre as concentrações de TGP plasmáticos.

Grupo	TGP (U / L)
Grupos 1- Salina	52,67 $\pm$ 3,03
Grupo 2 - Eletroacupuntura	55,30 $\pm$ 3,17
Grupo 3 - Trans - Anetol	60,00 $\pm$ 4,23
Grupo 4 - Eletroacupuntura + Trans-Anetol	45,09 $\pm$ 4,09

Fonte: Dados da pesquisa. Os valores são expressos em média  $\pm$  EPM, (n = 9 - 11). One way ANOVA - Tukey Multiple Comparison Test, sem significância estatística.

Figura 8 - Efeitos da Eletroacupuntura (100 Hz) e/ou do Trans-anetol em ratos submetidos a Estresse Crônico Moderado Imprevisível (ECMI) sobre as concentrações de TGP plasmáticos.



Fonte: Dados da pesquisa. Os animais foram submetidos ao protocolo de Estresse Crônico Moderado e, posteriormente, tratados com Salina (G1), Eletroacupuntura (G2), Trans-anetol (G3) e Eletroacupuntura + Trans - Anetol (G4). Os valores são expressos em média  $\pm$  EPM, (n = 9 - 11). One way ANOVA - Tukey Multiple Comparison Test, sem significância estatística.

#### 4.3.2 A Eletroacupuntura e/ou Trans-anetol reduzem a mieloperoxidase (MPO) hepática

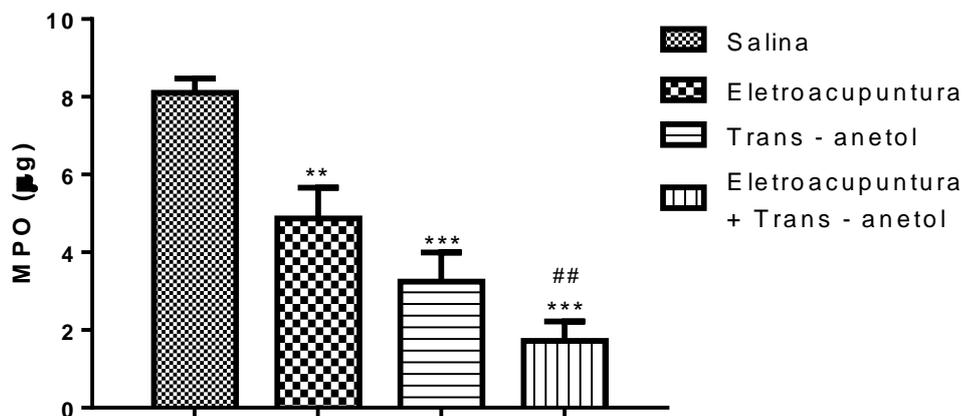
O tratamento com Eletroacupuntura isolada – G2 reduziram os níveis hepáticos de MPO em 39,87% (Média  $\pm$  EPM; G2:  $4,87 \pm 0,79$  vs Salina:  $8,10 \pm 0,36$   $\mu\text{g}$ ). Nesse mesmo sentido, os grupos tratados com Trans-Anetol e Eletroacupuntura + Trans-Anetol reduziram, respectivamente, 60,00% (Média  $\pm$  EPM; G3:  $3,24 \pm 0,74$  vs Salina:  $8,10 \pm 0,36$   $\mu\text{g}$ ) e 78,76% (Média  $\pm$  EPM; G3:  $1,72 \pm 0,50$  vs Salina:  $8,10 \pm 0,36$   $\mu\text{g}$ ), comparado com o grupo controle. Percebe-se também que o grupo tratado com Eletroacupuntura + Anetol apresentou redução de 64,68% ( $1,72 \pm 0,50$   $\mu\text{g}$ ) na quantidade MPO hepático quando comparado ao grupo tratado apenas com Eletroacupuntura ( $4,87 \pm 0,79$   $\mu\text{g}$ ) (Tabela 6, Figura 9).

Tabela 6 - Efeitos da Eletroacupuntura (100 Hz) e/ou do Trans-anetol em ratos submetidos a Estresse Crônico Moderado Imprevisível (ECMI) sobre as concentrações de MPO no hepático.

Grupo	MPO
Grupo 1 - Salina	8,11 ± 0,36
Grupo 2 -Eletroacupuntura **	4,87 ± 0,79
Grupo 3 -Trans-anetol ***	3,25 ± 0,74
Grupo 4 - Eletroacupuntura + Trans-anetol *** ##	1,72 ± 0,50

Fonte: Dados da pesquisa. Os animais foram submetidos ao protocolo de Estresse Crônico Moderado e, posteriormente, tratados com salina (G1), Eletroacupuntura (G2), Trans-anetol (G3) e Eletroacupuntura + Trans-anetol (G4). Os valores são expressos em média ± EPM, (n = 9 - 11). \*\* p<0,01; \*\*\* p<0,001 em relação à salina; ## p<0,01 em relação à eletroacupuntura (One way ANOVA - Tukey Multiple Comparison Test).

Figura 9 - Efeitos da Eletroacupuntura (100 Hz) e/ou do Trans-anetol em ratos submetidos a Estresse Crônico Moderado Imprevisível (ECMI) sobre as concentrações de MPO no hepático.



Fonte: Dados da pesquisa. Os animais foram submetidos ao protocolo de Estresse Crônico Moderado e, posteriormente, tratados com salina (G1), Eletroacupuntura (G2), Trans-anetol (G3) e Eletroacupuntura + Trans-anetol (G4). Os valores são expressos em média ± EPM, (n = 9 - 11). \*\* p<0,01; \*\*\* p<0,001 em relação à salina; ## p<0,01 em relação à eletroacupuntura (One way ANOVA - Tukey Multiple Comparison Test).

### 4.3.3 A Eletroacupuntura e/ou Trans-anetol reduzem TBARS plasmático e hepático

Em relação ao TBARS plasmático, o grupo G2 - Eletroacupuntura isolada ( $0,14 \pm 0,03$ ) apresentou redução de 39,13% quando comparado ao grupo G1 – Salina ( $0,23 \pm 0,02 \mu\text{mol/L}$ ), no entanto, sem significância estatística. Já os grupos tratados com Trans-anetol e Eletroacupuntura + Trans-anetol reduziram, respectivamente, 60% (Média  $\pm$  EPM; G3:  $0,09 \pm 0,02$  vs Salina  $0,23 \pm 0,02 \mu\text{mol/L}$ ) e 91,30% (Média  $\pm$  EPM; G4:  $0,02 \pm 0,00$  vs Salina  $0,23 \pm 0,02 \mu\text{mol/L}$ ), estatisticamente significante. Ademais, o tratamento com Eletroacupuntura + Trans-anetol também apresentou redução significativa no TBARS quando comparado com a Eletroacupuntura isolada, de 85,71% (Média  $\pm$  EPM; G4:  $0,02 \pm 0,00$  vs G2:  $0,14 \pm 0,03 \mu\text{mol/L}$ ) (Tabela 7, Figura 10).

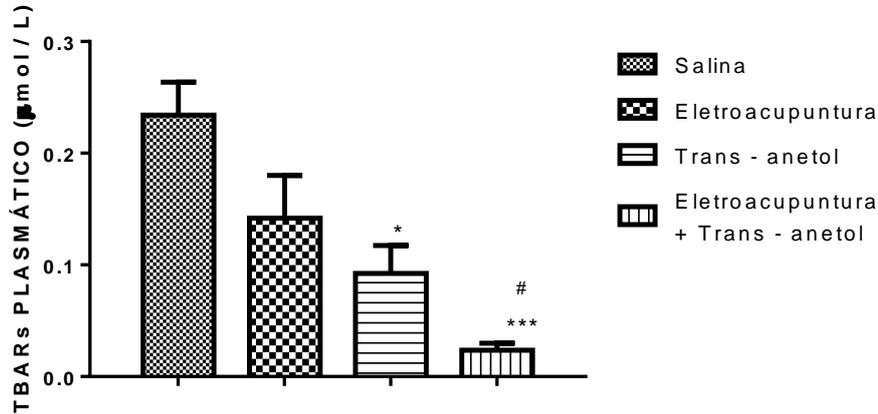
Quanto aos valores do TBARS hepático, o padrão semelhante ao TBARS plasmático foi evidenciado, com redução significativa dos grupos G2 - Eletroacupuntura isolada ( $0,23 \pm 0,03 \mu\text{mol/L}$ ), G3 – Trans-anetol ( $0,19 \pm 0,03 \mu\text{mol/L}$ ) e G4 – Eletroacupuntura + Trans-anetol ( $0,11 \pm 0,01 \mu\text{mol/L}$ ) em relação ao grupo G1 – Salina ( $0,43 \pm 0,03$ ) em 46,51%, 55,81% e 74,41%, respectivamente. Além disso, o grupo tratado com Eletroacupuntura + Trans-anetol também apresentou redução significativa no TBARS hepático quando comparado com grupo Eletroacupuntura isolada, de 85,71% (Média  $\pm$  EPM; G4:  $0,11 \pm 0,01$  vs G2:  $0,23 \pm 0,03 \mu\text{mol/L}$ ) (Tabela 8, Figura 11).

Tabela 7- Efeitos da Eletroacupuntura (100 Hz) e/ou do Trans-anetol em ratos submetidos a Estresse Crônico Moderado Imprevisível (ECMI) sobre as concentrações de TBARs plasmático.

Grupo	TBARs Plasmático
Grupos 1 - Salina	$0,23 \pm 0,03$
Grupo 2 - Eletroacupuntura	$0,14 \pm 0,04$
Grupo 3 - Trans-anetol *	$0,09 \pm 0,02$
Grupo 4 - Eletroacupuntura + Trans-Anetol *** #	$0,02 \pm 0,01$

Fonte: Dados da pesquisa. Os animais foram submetidos ao protocolo de Estresse Crônico Moderado e, posteriormente, tratados com salina (G1), Eletroacupuntura (G2), Trans-anetol (G3) e Eletroacupuntura + Trans-anetol (G4). Os valores são expressos em média  $\pm$  EPM, (n = 9 - 11). \*  $p < 0,05$ ; \*\*\*  $p < 0,001$  em relação à salina; #  $p < 0,05$  em relação à eletroacupuntura (One way ANOVA - Tukey Multiple Comparison Test).

Figura 10 - Efeitos da Eletroacupuntura (100 Hz) e/ou do Trans-anetol em ratos submetidos a Estresse Crônico Moderado Imprevisível (ECMI) sobre as concentrações de TBARs plasmático.



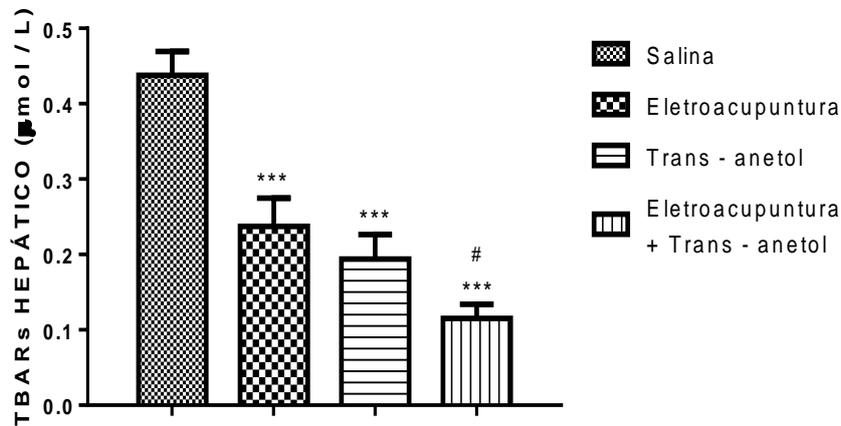
Fonte: Dados da pesquisa. Os animais foram submetidos ao protocolo de Estresse Crônico Moderado e, posteriormente, tratados com salina (G1), Eletroacupuntura (G2), Trans-anetol (G3) e Eletroacupuntura + Trans-anetol (G4). Os valores são expressos em média  $\pm$  EPM, (n = 9 - 11). \* p<0,05; \*\*\* p<0,001 em relação à salina; # p<0,05 em relação à eletroacupuntura (One way ANOVA - Tukey Multiple Comparison Test).

Tabela 8- Efeitos da Eletroacupuntura (100 Hz) e/ou do Trans-anetol em ratos submetidos a Estresse Crônico Moderado Imprevisível (ECMI) sobre as concentrações de TBARs hepático.

Grupo	TBARs Hepático
Grupo 1 - Salina	0,44 $\pm$ 0,03
Grupo 2 - Eletroacupuntura ***	0,24 $\pm$ 0,04
Grupo 3 - Trans-anetol***	0,19 $\pm$ 0,03
Grupo 4 - Eletroacupuntura + Trans-anetol*** #	0,12 $\pm$ 0,02

Fonte: Dados da pesquisa. Os animais foram submetidos ao protocolo de Estresse Crônico Moderado e, posteriormente, tratados com salina (G1), Eletroacupuntura (G2), Trans-anetol (G3) e Eletroacupuntura + Trans-anetol (G4). Os valores são expressos em média  $\pm$  EPM, (n = 9 - 11). \* p<0,05; \*\*\* p<0,001 em relação à salina; # p<0,05 em relação à eletroacupuntura (One way ANOVA - Tukey Multiple Comparison Test).

Figura 11 - Efeitos da Eletroacupuntura (100 Hz) e/ou do Trans-anetol em ratos submetidos a Estresse Crônico Moderado Imprevisível (ECMI) sobre as concentrações de TBARs hepático.



Fonte: Dados da pesquisa. Os animais foram submetidos ao protocolo de Estresse Crônico Moderado e, posteriormente, tratados com salina (G1), Eletroacupuntura (G2), Trans-anetol (G3) e Eletroacupuntura + Trans-anetol (G4). Os valores são expressos em média  $\pm$  EPM, (n = 9 - 11). \* p<0,05; \*\*\* p<0,001 em relação à salina; # p<0,05 em relação à eletroacupuntura (One way ANOVA - Tukey Multiple Comparison Test).

#### 4.3.4 A Eletroacupuntura e/ou Trans-anetol aumentam níveis de Glutathiona plasmática e hepática

O tratamento com Eletroacupuntura apresentou aumento significativo de glutathiona plasmática, de 59,33% (Média  $\pm$  EPM; G2: 105,05  $\pm$  3,25 vs Salina 65,93  $\pm$  1,84  $\mu$ g/g). Os grupos G3 – Trans-anetol (140,38  $\pm$  4,89) e o grupo G4 – Eletroacupuntura + Trans-anetol (216,31  $\pm$  4,73  $\mu$ g/g) aumentaram em 121,92% e 228,09%, respectivamente, a glutathiona plasmática em comparação ao grupo que recebeu Salina (65,93  $\pm$  1,84  $\mu$ g/g). (Tabela 9, Figura 12). Concomitantemente, houve aumento significativo nos níveis de glutathiona nos grupos G3 – Trans-anetol (140,38  $\pm$  4,89  $\mu$ g/g) e o grupo G4 – Eletroacupuntura + Trans-anetol (216,31  $\pm$  4,73  $\mu$ g/g) em relação ao grupo G2 – Eletroacupuntura (105,05  $\pm$  3,25  $\mu$ g/g) em 33,63% e 105,91%, respectivamente. Ademais, o grupo Eletroacupuntura + Trans-anetol também apresentou aumento significativo de 54,08% a glutathiona plasmática em relação ao grupo tratado com Trans-anetol (Média  $\pm$  EPM; G4: 216,31  $\pm$  4,73 vs G3: 140,38  $\pm$  4,89  $\mu$ g/g) (Tabela 9, Figura 12).

Quanto à dosagem de glutathiona hepática houve o mesmo padrão de aumento nos grupos tratados Eletroacupuntura, Trans-anetol e Eletroacupuntura + Trans-anetol, quando

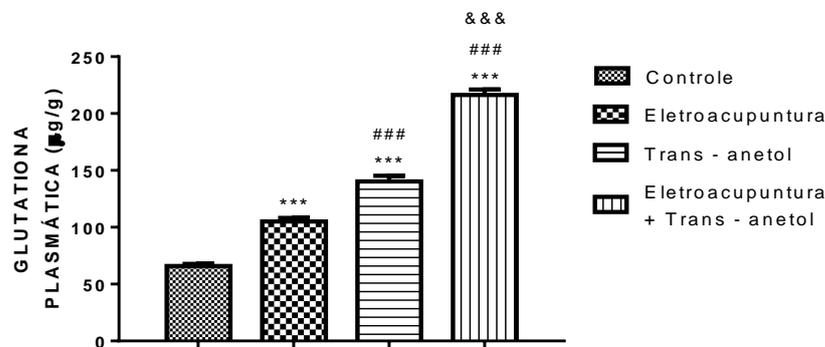
comparado com o Grupo Salina, respectivamente, de 21,67%, 40,05% e 90,04% 59,33% 121,92% e 228,09%, (Média  $\pm$  EPM; G2: 203,19  $\pm$  3,53  $\mu\text{g/g}$ ; G3: 233,89  $\pm$  6,82  $\mu\text{g/g}$ , G4: 317,37  $\pm$  4,72  $\mu\text{g/g}$  vs Salina 167,00  $\pm$  1,84  $\mu\text{g/g}$ ). Além disso, houve aumento significativo nos níveis de glutathiona nos grupos G3 – Trans-anetol (233,89  $\pm$  6,82  $\mu\text{g/g}$ ) em 15,10% e o grupo G4 – Eletroacupuntura + Trans-anetol (317,37  $\pm$  4,72  $\mu\text{g/g}$ ) em 56,19% com relação ao grupo G2 – Eletroacupuntura (203,19  $\pm$  3,53  $\mu\text{g/g}$ ). Por fim, o grupo tratado com Eletroacupuntura + Trans-anetol apresentou aumento significativo de 35,69% da glutathiona plasmática em relação ao grupo tratado com Trans-anetol (Média  $\pm$  EPM; G4: 317,37  $\pm$  4,72  $\mu\text{g/g}$  vs G3: 233,89  $\pm$  6,82  $\mu\text{g/g}$ ) (Tabela 10, Figura 13).

Tabela 9 - Efeitos da Eletroacupuntura (100 Hz) e/ou do Trans-anetol em ratos submetidos a Estresse Crônico Moderado Imprevisível (ECMI) sobre as concentrações de glutathiona plasmática.

Grupo	Glutathiona Plasmática
Grupo 1 - Salina	65,94 $\pm$ 1,85
Grupo 2 – Eletroacupuntura ***	105,06 $\pm$ 3,25
Grupo 3 - Trans-anetol *** ###	140,39 $\pm$ 4,89
Grupo 4 - Eletroacupuntura + Trans-anetol *** ### &&&	216,32 $\pm$ 4,73

Fonte: Dados da pesquisa. Os animais foram submetidos ao protocolo de Estresse Crônico Moderado e, posteriormente, tratados com Salina (G1), Eletroacupuntura (G2), Trans-anetol (G3) e Eletroacupuntura + Trans-anetol (G4). Os valores são expressos em média  $\pm$  EPM, (n = 9 - 11). \*\*\* p<0,001 em relação à salina; ### p<0,001 em relação à eletroacupuntura; &&& p< 0,001 em relação ao Trans-anetol (One way ANOVA - Tukey Multiple Comparison Test).

Figura 12 - Efeitos da Eletroacupuntura (100 Hz) e/ou do Trans-anetol em ratos submetidos a Estresse Crônico Moderado Imprevisível (ECMI) sobre as concentrações de glutathiona plasmática.



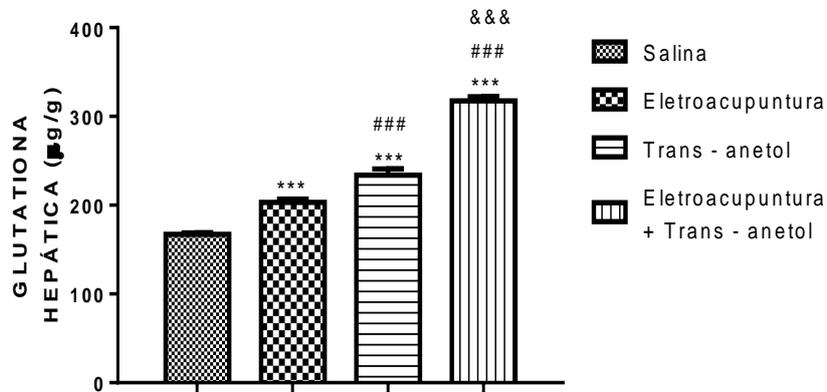
Fonte: Dados da pesquisa. Os animais foram submetidos ao protocolo de Estresse Crônico Moderado e, posteriormente, tratados com Salina (G1), Eletroacupuntura (G2), Trans-anetol (G3) e Eletroacupuntura + trans-anetol (G4). Os valores são expressos em média  $\pm$  EPM, (n = 9 - 11). \*\*\* p<0,001 em relação à salina; ### p<0,001 em relação à eletroacupuntura; &&& p< 0,001 em relação ao trans-anetol (One way ANOVA - Tukey Multiple Comparison Test).

Tabela 10 - Efeitos da Eletroacupuntura (100 Hz) e/ou do Trans-anetol em ratos submetidos a Estresse Crônico Moderado Imprevisível (ECMI) sobre as concentrações de glutathiona hepática.

Grupo	Glutathiona Hepática
Grupo 1 - Salina	167,00 $\pm$ 1,85
Grupo 2 – Eletroacupuntura ***	203,19 $\pm$ 3,54
Grupo 3 - Trans-anetol *** ###	233,89 $\pm$ 6,82
Grupo 4 - Eletroacupuntura + Trans-anetol *** ### &&&	317,38 $\pm$ 4,73

Fonte: Dados da pesquisa. Os animais foram submetidos ao protocolo de Estresse Crônico Moderado e, posteriormente, tratados com Salina (G1), Eletroacupuntura (G2), Trans-anetol (G3) e Eletroacupuntura + trans-anetol (G4). Os valores são expressos em média  $\pm$  EPM, (n = 9 - 11). \*\*\* p<0,001 em relação à salina; ### p<0,001 em relação à Eletroacupuntura; &&& p< 0,001 em relação ao Trans-anetol (One way ANOVA - Tukey Multiple Comparison Test).

Figura 13 - Efeitos da Eletroacupuntura (100 Hz) e/ou do Trans-anetol em ratos submetidos a Estresse Crônico Moderado Imprevisível (ECMI) sobre as concentrações de glutathiona hepática.



Fonte: Dados da pesquisa. Os animais foram submetidos ao protocolo de Estresse Crônico Moderado e, posteriormente, tratados com Salina (G1), Eletroacupuntura (G2), Trans-anetol (G3) e Eletroacupuntura + trans-anetol (G4). Os valores são expressos em média  $\pm$  EPM, (n = 9 - 11). \*\*\*  $p < 0,001$  em relação à salina; ###  $p < 0,001$  em relação à Eletroacupuntura; &&&  $p < 0,001$  em relação ao Trans-anetol (One way ANOVA - Tukey Multiple Comparison Test).

#### 4.4 Principais efeitos anti-inflamatório e anti-oxidante da Eletroacupuntura 100Hz e/ou Trans-anetol

Assim, pode-se perceber com a Tabela 11 que a terapia isolada com Trans-anetol ou com Eletroacupuntura tiveram efeitos semelhantes quanto ao TBARs hepático e GSH sérico e hepático apresentando diferença apenas nos parâmetros de MPO e TBARS plasmático. Ademais, o Trans-anetol mostrou-se superior a Eletroacupuntura (100Hz) quanto ao GSH. Quando comparado a terapia combinada ao uso isolado de Trans-anetol percebeu-se melhoria no teor de GSH plasmático e hepático. A terapia combinada apresentou, ainda, maior significância quanto a todos os parâmetros avaliados comparando com a terapia isolada de Eletroacupuntura 100Hz.

Tabela 11 – Resumo esquemático dos principais efeitos anti-inflamatórios e anti-oxidantes da Eletroacupuntura 100Hz e/ou Trans-anetol que apresentaram significância estatística

	<b>MPO</b>	<b>TBARS (p)</b>	<b>TBARS (h)</b>	<b>GSH (p)</b>	<b>GSH (h)</b>
<b>EAc 100 Hz *</b>	↓↓	∅	↓↓↓	↑↑↑	↑↑↑
<b>Trans- anetol *</b>	↓↓↓	↓	↓↓↓	↑↑↑	↑↑↑
<b>Terapia combinada*</b>	↓↓↓	↓↓↓	↓↓↓	↑↑↑	↑↑↑
<b>EAc100 Hz × Trans-anetol **</b>	∅	∅	∅	↑↑↑	↑↑↑
<b>Trans-anetol × T. Combinada***</b>	∅	∅	∅	↑↑↑	↑↑↑
<b>EAc 100 Hz × T. combinada***</b>	↓↓	↓	↓	↑↑↑	↑↑↑

Fonte: Dados da pesquisa. \*Comparado ao Grupo 1 que não teve tratamento. \*\* Comparação entre as duas terapias isoladamente. \*\*\* Comparando e terapia combinada (Trans-anetol e EAc 100 Hz) com as demais.

## 5 DISCUSSÃO

Dentre as diversas alterações que podem ocorrer em função do estresse/depressão a oscilação de peso corporal pode representar uma interação entre o estado patológico e as condições ambientais. Variações que corroboram com perda de peso durante o ECMI podem estar associada tanto aos períodos de privação de água e ração em que os sujeitos são submetidos nesse processo, como, também, presença de estímulos aversivos a buscar o alimento, já que no ECMI o animal está a todo tempo em contato com um estímulo estressor. Estudos mostram que a redução no peso corporal em animais submetidos a estresse pode ser igual ou superior a 20%, indo de acordo com o encontrado nesse trabalho (TOMANARI *et al.*, 2003; DOLABELA, 2004; RODRIGUES, 2005; BOGGIANO *et al.*, 2007; WILLNER; 2005; YANG *et al.*, 2019).

É provável, ainda, que outros efeitos metabólicos também estejam relacionados a oscilação de peso. De fato, a liberação crônica de glicocorticoides aumenta a temperatura corporal e o gasto total de energia e altera os padrões de sono, os quais podem promover reduções na massa corporal, mesmo em condições de consumo alimentar normal (LU *et al.* 2016).

Além disso, estressores físicos ou imunológicos, como os desencadeados pelo ECMI, estão mais associados à perda de peso. Com a cessação do estressor há reestabelecimento do balanço energético neuroendócrino, porém parece não haver uma integração adequada das respostas no nível hipotalâmico, o que pode inclusive indicar, danos em áreas cerebrais pelo estímulo estressor, resultando em ganho nulo ou reduzido de peso corporal como ocorrido nesse estudo com impacto do ECMI de 39,6% sobre o ganho de peso (LÓPEZ *et al.*, 2018).

Como já elucidado o estresse crônico moderado induz um estado semelhante à anedonia em ratos e comparável com sintomas de depressão em humanos. Após 28 dias de exposição ao ECMI, YANG *et al.* (2019) encontrou, em experimento animal, um aumento dos níveis de ansiedade e menor consumo de solução doce em comparação aos ratos controle. No presente estudo o ECMI foi capaz de induzir a reduções de até dez vezes a ingestão preferencial a sacarose quando comparado com início do experimento assim como encontrado por Bekris *et al.* (2005). Isso pode ser reforçado quando comparado com os achados de Oliveira (2009), que constatou que o decréscimo da preferência a sacarose relacionado ao estresse crônico moderado quando instaurado pode ser mantido por um período superior a três semanas se não houver intervenções terapêuticas.

Outros estudos apontaram, ainda, o efeito do ECMI em parâmetros bioquímicos no sangue. Pal *et al.* (2011) mostrou que houve aumento significativo da corticosterona plasmática e produtos da peroxidação lipídica, via malondialdeído, e uma redução dos níveis de glutathiona reduzida associados ao estressor, Lu *et al.* (2016), ainda correlaciona a hipercortisolemia ao aumento de NF- $\kappa$ B, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  séricos e neurais e Bachis *et al.* (2008), associa a um aumento de caspase-3 detectável nos neurônios do córtex cerebral, sugerindo apoptose. A partir desses estudos é possível inferir que os aumentos de MDA e redução de GSH observados nos grupos controles dessa pesquisa podem ser produtos da hipercortisolemia, capaz de produzir espécies reativas de oxigênio e promover a mediação inflamatória neural. Esses marcadores elucidam possíveis vias de imunomodulação da morte neural induzida pelo estresse crônico.

Desse modo se faz importante encontrar terapêuticas capazes de atenuar e/ou reverter esse quadro. Os antidepressivos atuais demonstram efeitos sobre essas vias, porém seu uso é até então contestado pela quantidade de efeitos colaterais associados e a necessidade crescente de doses cada vez maiores. Devido a isso, pesquisas clínicas propuseram uma estratégia complementar de combinação terapêutica, combinando Inibidores Seletivos da Receptação de Serotonina (ISRS) com Eletroacupuntura. Essa terapia se mostrou promissora, já que o uso conjunto pode levar o alívio dos sintomas na 1<sup>o</sup> semana de uso (ZHANG *et al.*, 2019).

Outra possibilidade foi descrita por ZHANG *et al.* (2019), no qual a EAc aplicada sem o uso concomitante de ISRS por 7 dias, tempo semelhante ao empregado nesta pesquisa (6 dias intercalados), tem efeitos semelhantes aos ISRS na redução da anedonia e ansiedade, bem como no aumento do peso corporal. Outros estudos apontaram alguns mecanismos como plasticidade sináptica, aumentando a expressão do receptor 5-HT em praticamente todas as áreas do cérebro. Esses resultados sugerem que a acupuntura tem efeitos semelhantes aos antidepressivos (LI *et al.*, 2017; ZHANG *et al.*, 2019).

O Trans-anetol por sua vez, possui diversos benefícios para a saúde humana como anti-inflamatórios, anticarcinogênicos e quimiopreventivos, antidiabéticos, imunomodulatórios, antitrombóticos, das quais destacamos, para este estudo, a função neuroprotetora, da qual foi descoberto alguns mecanismo possível como bloqueio da excitotoxicidade, redução do estresse oxidativo e a disfunção mitocondrial melhorando, significativamente, a lesão celular neuronal induzida por oxigênio-glicose, um modelo *in vitro* de isquemia (RYU *et al.*, 2014).

Assim, de acordo com Bretherick *et al.* (2015) e Teixeira *et al.* (2013) tanto a eletroacupuntura e quanto o Trans-anetol demonstraram, separadamente, efeitos preventivos de perda de peso, seja pela diminuição do estresse oxidativo ou pela retomada ao prazer as atividades, o que corrobora com aumento de peso em todos os grupos tratados. Teixeira *et al.* (2013) ainda destaca que o Trans-anetol (Grupo 3) pode apresentar predisposição ao ganho de peso pelo incremento ao consumo de ração.

O ECMI ainda pode provocar agressão hepática causada por estresse oxidativo pode levar a danos hepatocelular, com alterações dos valores de TGO e/ou TGP. Geralmente esse aumento é assintomático, transitório e resolve-se após a descontinuação do estímulo, caso seja agudo. Os dados dos diversos estudos são muito consistentes em mostrar que a hepatotoxicidade é rara (< 2%), mas quando ocorre manifesta-se com aumento de TGP e/ou TGO. Desse modo as enzimas, usualmente, aumentam nas primeiras 12 semanas exposta ao estressor crônico, o que justificaria, neste estudo, com 6 semanas de ECMI, nenhuma modificação significativa (BERTOLAMI, 2005).

É importante ressaltar que, assim como visto em outros estudos, parâmetros como GSH hepática reduzida e MPO e TBARS aumentados podem ser validos para sugerir processo inflamatório em curso. Wang e colaboradores (2005) ainda apontaram que esses marcadores bioquímicos podem indicar o grau de evolução para fibrose hepatocelular imunológica. Assim, a redução desses mediadores inflamatórios e aumento dos parâmetros antioxidantes se mostraram capazes de apontar os benéficos de uma terapêutica sobre redução fibrose hepática em ratos por inibição da síntese de colágeno e diminuição do estresse oxidativo.

Além disso, outros estudos corroboram com a importância desses marcadores no que tange a neuroinflamação. Luan *et al.* (2018) forneceram evidências de que o gene codificador da enzima MPO e a expressão de MPO são importantes para a regulação do funcionamento cognitivo. Assim como Liu e colaboradores (2017) indicaram que níveis séricos mais altos de MDA estavam relacionados a um maior risco de desenvolvimento de depressão e sintomatologia mais grave. Freed *et al.* (2017) relatou ainda que níveis de GSH sérico foram mais baixos em adolescentes com Transtorno depressivo maior. Demonstrando, assim, a validade desses marcadores como parâmetros quantitativos de possíveis vias da neuromodulação da depressão.

Assim, o uso da acupuntura isoladamente no ponto *Zusanli*, um dos pontos de escolha para o grupo G3 deste estudo, já demonstrou efeitos sobre o comportamento e a inflamação aumentando GSH, reduzindo MDA e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no cérebro, inibindo a peroxidação

lipídica. O uso de EAc parecer ser ainda mais promissor reduzindo malondialdeído (MDA) e o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), aumentando o conteúdo de catalase (CAT) e glutathiona (GSH) no hipocampo de camundongos tratados além de impedir o aumento de citocinas pró-inflamatórias como a interleucina- $1\beta$  (IL- $1\beta$ ), interleucina-6 (IL-6) e fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) no hipocampo, esse mecanismo também pareceu influenciar na disponibilidade de serotonina na fenda sináptica, um dos principais neurotransmissores envolvidos na depressão (SHANG *et al.*, 2018; HAN *et al.*, 2018; CAI *et al.*, 2019).

O Trans-anetol e seus análogos estruturais se mostraram importantes na inibição de eventos de sinalização de TNF- $\alpha$  induzidos por GSH. Esses mecanismos ainda não estão claros, mas foi sugerido que ocorrem por meio de aumento dos níveis intracelulares de GSH ocasionando inibição da ativação de NF- $\kappa$ B (CHAINY *et al.*, 2000). Estudos mais recentes trazem o efeito do GSH mediados pelo Trans-anetol no cérebro, com evidências de melhora significativa da aprendizagem de ratos jovens e idosos. Essa melhoria foi associada além da presença de GSH a uma inibição de enzimas responsáveis pela hidrólise de diversos neurotransmissores, como acetilcolinesterase cerebral e da butirilcolinesterase. O aumento da atividade colinérgica do cérebro associado a presença de anti-oxidantes endógenos sugestiona sua modulação do Trans-anetol em outras vias (DHINGRA; SONI, 2018).

Desse modo, a produção e o desbalanço de EROs podem ser controladas por meio do uso de substâncias antioxidantes, que mesmo em pequenas concentrações possuem a função de inibir ou atrasar a oxidação de um substrato. O aumento de GSH sérico e tecidual em resposta ao tratamento de eletroacupuntura por Acioli (2014), Albuquerque (2016) e ao tratamento com Trans-anetol por Morais (2018) o GSH demonstram, individualmente um resultado antioxidante promissor assim como encontrado nessa pesquisa em G2 (Eletroacupuntura 100hz) e G3 (Trans-anetol). Além disso o tratamento conjunto (G4) apresentou-se significativamente mais elevado quando comparado com os tratamentos isolados, demonstrando que a terapia coadjuvante possui importância crucial no balanço das espécies reativas de oxigênio na proteção local e sistêmica (HUBER *et. al.*, 2008).

Para avaliação do dano celular pelo estresse oxidativo um outro método seria a quantificação do MDA produzido na peroxidação lipídica de determinado tecido, nesse estudo o fígado, como uma amostra do processo pró-inflamatório sistêmico, sob um fator oxidante específico, pode ser analisado através do método de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Assim, essa substância pode ser considerada como produto da peroxidação dos lipídeos. É um metabólito da lipoperoxidação que exprime indiretamente a ação dos radicais livres no soro, servindo na avaliação do estresse oxidativo. A presença dele

indica estresse oxidativo em curso (ARNHOLD; HECK, 2014). Desse modo, a produção e/ou ingestão de agentes antioxidantes pode equilibrar esse processo e reduzir os prováveis danos ao organismo (FREIRE *et al.*, 2005).

Estudos anteriores demonstraram que o pré-tratamento com Trans-anetol reduz a produção de TBARS, em processo inflamatório desencadeado por carragenina. Esse achado reforça a ideia de que o Trans-anetol é capaz de inibir a produção de espécies reativas de nitrogênio e de oxigênio. Além disso, outros estudos realizados *in vivo* e *in vitro* confirmam esse efeito (GALICKA *et al.*, 2014; PONTE, 2015)

Desse modo, o tratamento com Trans-anetol e a eletroacupuntura (100Hz) apresentaram, assim como visto em outros estudos, uma redução na produção de TBARS, indicando, indiretamente, menor produção de EROs (ALBUQUERQUE, 2016; COLUSSO, 2016). Reforçando, nesse estudo, a ideia de que o Trans-anetol e a eletroacupuntura como terapia conjunta incrementam ação antioxidante, pela inibição da produção de radicais livres (FREIRE *et al.*, 2005; GALICKA *et al.*, 2014; PONTE, 2015; ALBUQUERQUE, 2016).

A mieloperoxidase (MPO), é um marcador de neutrófilos teciduais responsável pela liberação de diversos grânulos que contêm mediadores inflamatórios, os quais desencadeiam uma cascata de reações visando combater o agente agressor. Como consequência desse processo ocorre dor, desconforto e até mesmo dano tecidual (KLAUMANN, 2008).

Logo, a presença de MPO no tecido pode sinalizar que o estresse crônico desencadeou um estado inflamatório sistêmico. Desse modo, a resposta compensatória ao estressor diário e imprevisível foi a ativação do sistema nervoso simpático, liberação hormonal no eixo HPA e neuroinflamação com presença de IL-1 e TNF- $\alpha$ , levando, como já visto, a redução de fatores tróficos, toxicidade aos oligodendrócitos, desmielinização e diminuição de monoaminas (LAGE, 2011; LIMA, 2012).

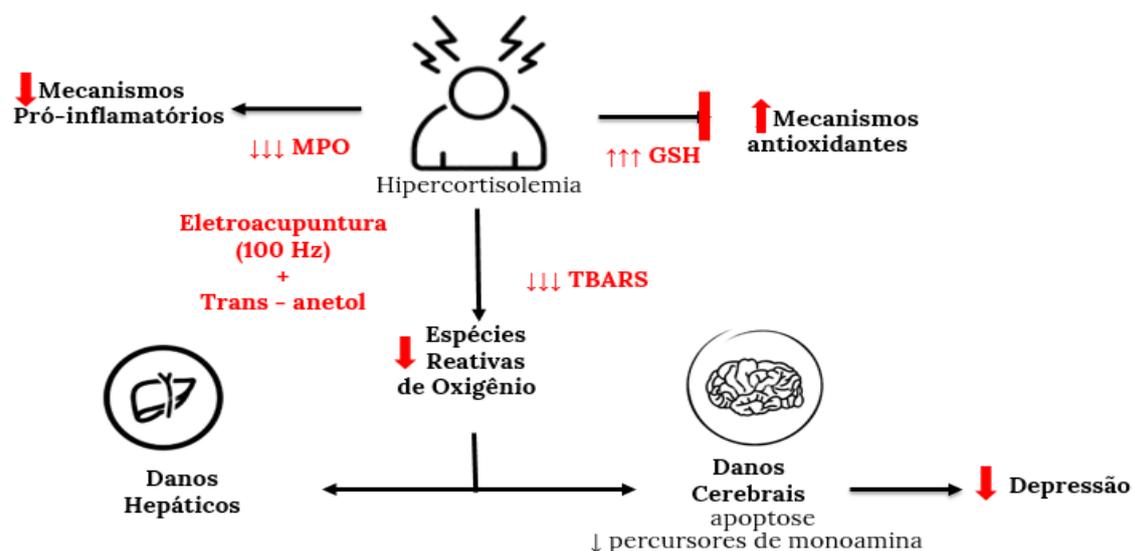
Estudo anteriores apontaram novamente a Eletroacupunutra no ponto *zusanli* e seu papel anti-inflamatório no SNA. Foi demonstrado uma redução de recrutamento de leucócitos da medula óssea assim como foi capaz de ativar linfócitos T reguladores pelo baço, garantindo uma redução do processo inflamatório sistêmico. De outra forma, ainda pareceu está envolvida na atividade vagal, uma das principais vias moduladoras da inflamação e da sinalização para o sistema nervoso central. Desse modo, a redução dos parâmetros de MPO hepáticos no grupo 2 (Eletroacupuntura 100 Hz) é um indicativo de ativação dessas funções (SHANG *et al.*, 2018; HAN *et al.*, 2018; CAI *et al.*, 2019; CHEN *et al.*, 2019).

O papel Trans-anetol na inflamação pode ser evidenciado pela redução do número de leucócitos no sítio inflamatório. Na depressão ocasionada por estresse o processo inflamatório é sistêmico, porém um fragmento de um órgão, como o fígado, parece ser uma amostra do processo global. Essa avaliação é corroborada por achados de Cho e colaboradores (2013) pela redução de MPO após tratamento com Trans-anetol na injúria hepática, do qual foi capaz ainda de reduzir a celularidade no sítio inflamatório e reduz a permeabilidade vascular somado a isso foi capaz de reduzir os níveis séricos de PCR (CHO et al., 2013; ESTEVÃO-SILVA *et al.*, 2014; PONTE, 2015).

Assim, pode-se afirmar que a redução de MPO dos demais grupos tratados quando comparado com o controle significa redução desse estado pró-inflamatório, corroborando com os achados de Acioli (2014) e Santos (2012) que apresentaram redução de MPO com o uso de eletroacupuntura, para Ritter *et al.*, (2013) houve redução da atividade da MPO e a produção de TNF- $\alpha$ , IL-1 IL-17 com o uso de Trans-anetol o que vai ao encontro da hipótese dessa pesquisa, que a terapia combinada teria efeito adicional a redução desse marcador inflamatório.

Desse modo, os parâmetros reduzidos de concentração TBARS e MPO e valores aumentados de GSH nos grupos tratados, corroboram com os achados de anti-inflamatórios e redução do estresse oxidativo sistêmicos e hepáticos (Figura 14).

Figura 14 - Resumo esquemático das possíveis vias de inflamação e oxidação sistêmica e neural induzida pelo estresse crônico elucidadas pela literatura associado aos efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes da Eletroacupuntura 100Hz e Trans - anetol encontrados nessa pesquisa.



Fonte: Dados da pesquisa.

Por fim, os resultados apresentados nesse estudo confirmam o efeito anti-inflamatório do Trans-anetol, da eletroacupuntura (100Hz) e a terapia coadjuvante com Trans-anetol e Eletroacupuntura indicando que, principalmente, a terapia coadjuvante apresenta-se favorável à redução dos principais processos da inflamação crônica, estresse e depressão pela redução dos efeitos inflamatório e pela modulação de efeito anti-inflamatórios endógenos quando comparados aos tratamentos isolados.

Os dados obtidos revelam que o Trans-anetol, molécula amplamente utilizada e consumida como aromatizante, junto a Eletroacupuntura 100 Hz terapia segura, livre de efeitos adversos, podem se tornar alternativa eficaz para o tratamento da depressão e doenças inflamatórias sistêmicas. No entanto, é necessário que sejam realizados estudos mais aprofundados, no sentido de compreender melhor o seu mecanismo de ação conjunto.

## **6 CONCLUSÃO**

Conclui-se que o tratamento com eletroacupuntura e/ou trans-anetol reduz o estresse oxidativo sistêmico e hepático em ratos submetidos ao estresse crônico moderado imprevisível. Percebeu-se também, que o tratamento conjunto (Eletoacupuntura 100Hz e Trans-anetol) apresenta efeito potencializador ao tratamento isolado (Eletroacupuntura).

## REFERÊNCIA

- ABELHA, L. Depressão, uma questão de saúde pública. **Cad. saúde colet**, 2014.
- ACIOLI, Porfírio Cezar Passos. **Efeitos da acupuntura e da eletroacupuntura sobre o estresse oxidativo e a inflamação decorrentes da torção/distorção do testículo em ratos**. Dissertação (Dissertação em ciências médico-cirúrgicas). Fortaleza, 2014.
- AGUILERA, G; KISS, A., LIU, Y; KAMITAKAHARA, A. Negative regulation of corticotropin releasing factor expression and limitation of stress response. **Stress**, v. 10, n. 2, p. 153-161, 2007.
- ALBUQUERQUE, A.O. **Efeitos modulatórios da acupuntura e da eletroacupuntura sobre a inflamação e o estresse oxidativo no fígado de ratos deprimidos**. Dissertação (Mestrado e Ciências Médico-cirúrgicas) - Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2016.
- ARAUJO, Álvaro Cabral; LOTUFO NETO, Francisco. A nova classificação Americana para os Transtornos Mentais: o DSM-5. **Rev. bras. ter. comport. cogn.** São Paulo , v. 16, n. 1, p. 67-82, abr. 2014.
- ARAUJO, A.N.V. **Investigação da atividade atinidepressiva do orto Eugenol em modelos comportamentais de depressão induzidos por dexametasona**. Dissertação (Mestrado em neurociência cognitiva e comportamento) – UFPB. João Pessoa, 2018.
- ARNHOLD, A. L; HECK, T. G. **Método de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (tbars), e sua importância para a avaliação da peroxidação lipídica em diversas aplicações**. Ensaio teórico. Rio Grande do Sul, 2014.
- BACHIS, Alessia et al. Chronic unpredictable stress promotes neuronal apoptosis in the cerebral cortex. **Neuroscience Letters**, v. 442, n. 2, p. 104-108, 2008.
- BACELAR JÚNIOR, A. J et al. **Imunologia do sofrimento: o estudo da depressão como um fenômeno neuroimunológico e o uso de biomarcadores periféricos associados com predisposição, diagnóstico e prognóstico da depressão**. *Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research*, v. 13, n.1, p. 97-105, 2016.
- BAKKALI, F., AVERBECK, S., AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils—a review. **Food and chemical toxicology**, v. 46, n. 2, p. 446-475, 2008.
- BAGOT, R. C. *et al.* Epigenetic signaling in psychiatric disorders: stress and depression. **Dialogues in Clinical Neuroscience**, v. 16, n. 3, p. 281-95, 2014.
- BARBOSA, Lívea Fujita. **Danos em DNA promovidos pela enzima Cu, Zn-superóxido dismutase. Implicações para a apoptose em um modelo celular de esclerose lateral amiotrófica**. Tese (Doutorado em Ciências Bioquímica). Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.
- BARBOSA, Kiriaque Barra Ferreira et al . Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Rev. Nutr.**, Campinas , v. 23, n. 4, p. 629-643, Aug. 2010.

BARIS C; KASIMAY, O; KOLGAZI M; ERSOY Y; ERCAN F; BERRAK C; YEGEN B.C. Stress-induced multiple organ damage in rats is ameliorated by the antioxidant and anxiolytic effects of regular exercise. **Cell BiochemFunct**, v.28, p. 469–479, 2010.

BEKRIS, Stathis *et al.* Behavioural and neurochemical effects induced by chronic mild stress applied to two different rat strains. **Behavioural brain research**, v. 161, n. 1, p. 45-59, 2005.

BERLIM, M. T., TURECKI, G. What is the meaning of treatment resistant/refractory major depression (TRD)? A systematic review of current randomized trials. **European Neuropsychopharmacology**, v. 17, n. 11, p. 696-707, 2007.

BERTOLAMI, Marcelo Chiara. Mecanismos de hepatotoxicidade. **Arq. Bras. Cardiol.**, São Paulo, v. 85, supl. 5, p. 25-27, Oct. 2005.

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

BERTON, R. P. B; LIBARDI C.A; CONCEIÇÃO, M.S; BONGANHA, V; NOGUEIRA, F.R.D; CHACON-MIKAHIL, M.P.T; CAVAGLIERI, C.R; MADRUGA, V.A. Dano muscular: resposta inflamatória sistêmica após ações excêntricas máximas **Rev. bras. Educ. Fís. Esporte**, São Paulo, v.26, n.3, p.367-74, 2012.

BESSER, Michal J.; GANOR, Yonatan; LEVITE, Mia. Dopamine by itself activates either D2, D3 or D1/D5 dopaminergic receptors in normal human T-cells and triggers the selective secretion of either IL-10, TNF $\alpha$  or both. **Journal of neuroimmunology**, v. 169, n. 1-2, p. 161-171, 2005.

BIRBEN, E. *et al.* Oxidative stress and antioxidant defense. **World Allergy Organization Journal**, v. 5, n. 1, p. 9-19, 2012.

BLACK, C. N; BOT, M; SCHEFFER, P. G; CUIJPERS, P; PENNINX, B. W. Is depression associated with increased oxidative stress? A systematic review and metaanalysis. **Psychoneuroendocrinology**, v. 51, p. 164-175, 2015.

BRHLIKOVA P. *et al.* Global Burden of Disease estimates of depression – how reliable is the epidemiological evidence? **Journal of the Royal Society of Medicine**, v. 1, n. 104, p. 25-34, 2011.

BILGEN, A. E; ZINCIR, S. B; ZINCIR, S; ÖZDEMİR, B; AK, M; AYDEMİR, E; ŞENER, İ. Effects of electroconvulsive therapy on serum levels of brain-derived neurotrophic factor and nerve growth factor in treatment resistant major depression. **Brain research bulletin**, v.104, p. 82-87, 2014.

BIRKL-TOEGLHOFER AM, BIRKL C, LLENOS IC, WEIS S, HAYBAECK J. Hepatic gene expression explains primary drug toxicity in bipolar disorder. **Transl Psychiatry**, v. 9, n. 9(1), p. 331, 2019.

BOGGIANO, M. N., ARTIGA, A. I; PRITCHETT, C. E; CHANDLER-LANEY, P. C; SMITH, M. L; ELDRIDGE, A. J. High intake of palatable food predicts binge-eating independent of susceptibility to obesity: An animal model of lean vs. obese binge-eating and

obesity with and without binge-eating. **Internacional Journal of Obesity**, v.31, p. 1357-136, 2007.

BOISSIER, J. R.; SIMON, P.; LE BOURHIS, B. Experimental psychotropic action of cis and trans isomers of anethole, **Therapie.**, v. 22, n. 2, p. 309 - 23, 1967.

BORRISTON LABORATORIES, Inc. **14-Day single dose subacute toxicity study in the rat with [trans-anethole]**. Borrison Laboratories, Inc., Temple Hills, MD. Unpublished Final Report, 1984.

BRADLEY J.R; THIRU S; POBER J.S. Disparate localization of 55-kd and 75-kd tumor necrosis factor receptors in human endothelial cells. **The American Journal of Pathology**, v. 146, n. 1, p. 27-32, 1995.

BRAIDY, Nady et al. O precursor da glutationa (GSH),  $\gamma$ -glutamilcisteína (GGC), pode melhorar os danos oxidativos e a neuroinflamação induzidos pelos oligômeros beta-amilóides nas células cerebrais humanas primárias em adultos. **Fronteiras no envelhecimento da neurociência** , v. 11, p. 177, 2019.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Aprova a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde**. Portaria nº 971, de 03 de maio de 2006.

BREThERICK, T. A. S; PATERNO, J.C; TAKADA, S. H; KIHARA, A. H. Bases neuroquímicas do tratamento da doença de Parkinson pela eletroacupuntura bases neuroquímicas do tratamento da doença de Parkinson pela eletroacupuntura. **Jornal eletrônico do instituto nanocell**, vol. 2, n. 17, Set 2015.

BRESSEL, M. A. B. **Intervenções farmacológicas para prevenção de nefropatia induzida por contraste: uma aplicação do método do tamanho ótimo da informação corrigido para heterogeneidade a fim de determinar se as evidências de uma metanálise são definitivas e conclusivas**. Dissertação (Mestrado em Epidemiologia). Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

BORGES FILHO, Carlos. **Avaliação da bioatividade do flavonóide crisina em camundongos submetidos ao estresse crônico moderado e imprevisível**. Dissertação. Universidade Federal do Pampa, Rio Grande do Sul, 2014.

BUMB, J. M; AKSAY, S. S; JANKE, C; KRANASTER, L; GEISEL, O; GASS, P; SARTORIUS, A. Focus on ECT seizure quality: serum BDNF as a peripheral biomarker in depressed patients. **European archives of psychiatry and clinical neuroscience**, v. 265, n.3, p. 227-232, 2015.

BURAN, İlay *et al.* Treatment with TREK1 and TRPC3/6 ion channel inhibitors upregulates microRNA expression in a mouse model of chronic mild stress. **Neuroscience letters**, v. 656, p. 51-57, 2017.

BUS, B. A. A.; MOLENDIJK, M. L. De neurotrofe hypothese van depressie. **Tijdschrift voor psychiatrie**, v. 58, n. 3, p. 215-222, 2016.

CAI, Wa et al. Antidepressant, anti-inflammatory, and antioxidant effects of electroacupuncture through sonic hedgehog–signaling pathway in a rat model of poststroke depression. **Neuropsychiatric disease and treatment**, v. 15, p. 1403, 2019.

CAI, Weibin et al. Effect of Electro-acupuncture at Scalp-acupoints on Motor Function and Oxidative Stress in Mice with Parkinson's Disease. **Journal of Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine**, v. 34, n. 2, p. 204-209, 2017.

CARVALHO, A. A.; FAUSTINO, L. R.; SILVA, C. M. G.; CASTRO, S. V.; LOBO, C. H.; SANTOS, F. W.; SANTOS, R. R.; CAMPELLO, C. C.; BORDIGNON, V.; FIGUEIREDO, J. R.; RODRIGUES, A. P. R. Catalase addition to vitrification solutions maintains goat ovarian preantral follicles stability. **Research in Veterinary Science**, v. 97, n. 1, p. 140–147, 2014.

CARRASCO, G. A; VAN DE KAR, L. D. Neuroendocrine pharmacology of stress. **European journal of pharmacology**, v. 463, n. 1-3, p. 235-272, 2003.

CAUJOLLE, F.; MEYNIER, D. Toxicité de l'estragole et des anétholes (cis et trans). **Séance du**, p.1465 -1468,1958.

CAVALCANTI, J.M.; LEAL-CARDOSO, J.H.; DINIZ, L.R.; PORTELLA, V.G.; COSTA, C.O.; LINARD, C.F.; ALVES, K., ROCHA, M.V.; LIMA, C.C.; CECATTO, V.M.; COELHO-DE-SOUZA, A.N. The essential oil of *Croton zehntneri* and trans-anethole improves cutaneous wound healing. **J Ethnopharmacol.** v. 21, n. 144, p. 240 – 247, 2012.

CHANDRASEKHAR, Y. *et al.* Antidepressant like effects of hydrolysable tannins of *Terminalia catappa* leaf extract via modulation of hippocampal plasticity and regulation of monoamine neurotransmitters subjected to chronic mild stress (CMS). **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 86, p. 414-425, 2017.

CHAN S. H. H. What is being stimulated in acupuncture: evaluation of the existence of a specific substrate. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 8, p. 25–33, 1984.

CHAINY, G. B.; MANNA, S. K.; CHATURVEDI, M. M.; AGGARWAL, B. B. Anethole blocks both early and late cellular responses transduced by tumor necrosis factor: effect on NF-kappaB, AP-1, JNK, MAPKK and apoptosis. **Oncogene**, v. 19, n. 25, p. 2943–2950, 2000.

CHAINY, Gagan BN et al. Anethole blocks both early and late cellular responses transduced by tumor necrosis factor: effect on NF-κB, AP-1, JNK, MAPKK and apoptosis. **Oncogene**, v. 19, n. 25, p. 2943-2950, 2000.

CHEN, Ying et al. Electroacupuncture Regulates Disorders of Gut-Brain Interaction by Decreasing Corticotropin-Releasing Factor in a Rat Model of IBS. **Gastroenterology research and practice**, v. 2019, 2019.

CHIANG C.Y; CHANG C.T; CHU H.L YANG L F. Peripheral afferent pathway for acupuncture analgesia. **Scientia Sinica**, v.16, p.210-217, 1973.

CHONGHUO, T. **Tratado de Medicina Chinesa**. SP, Roca, 1993.

CHO, H.I; KIM, K.M.; KWAK, J.H.; LEE, S.K.; LEE, S.M. Protective mechanism of anethole on hepatic ischemia/reperfusion injury in mice. **J Nat Prod.** v.76, n. 9, p. 1717 – 23, 2013.

CHOPRA, K., KUMAR, B., & KUHAD, A. Pathobiological targets of depression. **Expert opinion on therapeutic targets**, v. 15, n. 4, p. 379-400, 2011.

CHUNG V. *et al.* Use of traditional chinese medicine in the Hong Kong special administrative region of China. **J Altern Complement Med.**, v. 13, n. 3, p. 361-7, Apr/2007.

CIVO-TNO. Volatile Components in Food-Qualitative and Quantitative Data, Supplement 5 to the 6th Edition. Edited by H. Maarse, C.A. Visscher, L.C. Willemsens, L.M. Nijssen, and M.H. Boelens. TNO Nutrition and Food Research. Zeist, **The Netherlands**, 2000.

COLUSSO, A.S. **Produção e caracterização de nanocápsulas contendo trans-anetol e avaliação in vitro da capacidade antioxidante.** Dissertação (Mestrado em Nanociência) - Centro Universitário Franciscano de Santa Maria, Santa Maria, RS 2016.

COSENTINO M, *et al.* Human CD4+CD25+ regulatory T cells selectively express tyrosine hydroxylase and contain endogenous catecholamines subserving an autocrine/paracrine inhibitory functional loop. **Blood.** v. 109, n. 2, p. 632–642, 2007.

COSTA, D.O; PEREIRA, S. **Efeitos neurofisiológicos da acupuntura no tratamento da ansiedade.** UNIVERSIDADE DE MOGI DAS CRUZES, são paulo, 2012.

COSTANZO, Linda S. **Fisiologia.** 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2014.

CRUZ, W.A.S.; CAMPA, A. **Atividade de mieloperoxidase e formação de oxigênio singlete em monócitos, macrófagos e células dendríticas:** localização versus atividade. Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FCF). Universidade de São Paulo (USP). São Paulo, SP, Brasil, Ago/ 2009.

CRUZ, K. S. **Otimização numérica da produção de glutatona por saccharomyces cerevisiae utilizando subprodutos industriais.** 136 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2016.

CRYAN J.F; HOLMES A; The ascent of mouse: advances in modelling human depression and anxiety. **Nat Rev Drug Discov** , v.4, p.775–790, 2005.

CZECH, B.; PEREZ-CRUZ, C.; FUCHS, E.; FLUGGE, G. Chronic stress-induced cellular changes in the media pré-frontal córtex and their potential clinical implications: does hemisphere location matter? **Behav Brain Res**, v. 190, n. 1, p. 13, 2008.

DANTZER, R; KELLEY, K.W. Twenty years of research on cytokine-induced sickness behavior. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 21, p. 153-160, 2007.

DOLABELA, A. C. F. O. **Um estudo sobre as possíveis interações entre o chronic mild stress e o desempenho operante.** (Dissertação de mestrado). Programa de estudos Pós-graduados em Psicologia Experimental: Análise do comportamento, Pontifícia Universidade Católica de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil, 2004.

DUMAN, R. S.; MONTEGGIA, L. A neurotrophic model for stress related mood disorders. **Biol Psychiatry**, v. 59, p. 1116-27, 2006.

DHIR, A; KULKARNI, S. K. Nitric oxide and major depression. **Nitric Oxide**, v. 24, n. 3, p. 125-131, 2011.

DHINGRA, Dinesh; SONI, Kapil. Nootropic activity of trans-anethole in young and middle-aged mice: possibly mediated through inhibition of brain acetyl- and butyrylcholinesterase activities and alleviation of oxidative stress. **European Journal of Biomedical**, v. 5, n. 6, p. 520-536, 2018.

DRUKARCH, B., FLIER, J., JONGENELEN, C., ANDRINGA, G. E CHOFFELMEER, A. O anetol antioxidante ditioleto inibe a monoamina oxidase-B, mas atividade da monoamina oxidase A em extratos de astrócitos cultivados. **J. Neural. Transm.**, v. 113, p. 593-598, 2006.

EL-SHAMY, Karima A. *et al.* Oral supplementation with geranium oil or anise oil ameliorates depressed rat-related symptoms through oils antioxidant effects. **Journal of Complementary and Integrative Medicine**, 2019.

ELHWUEGI, A. S. Central monoamines and their role in major depression. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 28, p.435-51, 2004.

ELWING, J.E; LUSTMAN, P.J; WANG, H.L; CLOUSE R.E; Depressão, ansiedade e esteatohepatite não-alcóolica. **Psychosom Med.**, v. 68, n. 4, p. 563-9, 2006.

ESTEVÃO-SILVA, C.F.; KUMMER, R.; FACHINI-QUEIROZ, F.C.; GRESPAN, R.; NOGUEIRA DE MELO, G.A.; BARONI, S.; CUMAN, R.K.; BERSANI-AMADO, C.A. Anethole and eugenol reduce in vitro and in vivo leukocyte migration induced by fMLP, LTB<sub>4</sub>, and carrageenan. **J Nat Med.** v. 68, n. 3, p. 567 – 75, 2014.

FAROOQ, RAI KHALID et al. "Papel das citocinas inflamatórias na depressão: foco na interleucina-1 $\beta$ ". **Relatórios biomédicos** v. 6, n. 1, p. 15-20, 2017.

FERRARI, F; VILLA, R. F. The neurobiology of depression: an integrated overview from biological theories to clinical evidence. **Molecular neurobiology**, v.54, n. 7, p. 4847- 4865, 2017.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Rev. Ass. Med. Brasil.**, v. 43, n. 1, p. 61-68, 1997.

FINKEL, M. S; LAGHRISSE-THODE, F; POLLOCK, B. G; RONG, J. Paroxetine is a novel nitric oxide synthase inhibitor. **Psychopharmacology bulletin**. 1996.

FILHO, C.B. **Avaliação da bioatividade do flavonóide crisina em camundongos submetidos ao estresse crônico moderado e imprevisível.** Universidade Federal do Pampa, RS, 2014.

FONSÊCA, D. V; SALGADO, P. R; NETO, H. D. C. A; GOLZIO, A. M; CALDAS FILHO, M. R., MELO, C. G; ALMEIDA, R. N. Ortho-eugenol exhibits anti-nociceptive

and antiinflammatory activities. **International immunopharmacology**, v. 38, p. 402-408, 2016.

FORBES, Naida F. *et al.* Chronic mild stress and sucrose consumption: validity as a model of depression. **Physiology & behavior**, v. 60, n. 6, p. 1481-1484, 1996.

FREED, Rachel D. *et al.* A pilot study of cortical glutathione in youth with depression. **Psychiatry Research: Neuroimaging**, v. 270, p. 54-60, 2017.

FORBES, NF, STEWART, CA, MATTHEWS, K. E REID, IC. Estresse leve crônico e consumo de sacarose: validade como modelo de depressão. **Physiol. Behav.** v.60, p.1481-1484, 1996.

FREIRE, R. S.; MORAIS, S. M.; CATUNDA, F. E. A.; PINHEIRO, D. C. S. N. Synthesis and antioxidant, anti-inflammatory and gastroprotector activities of anethole and related compounds. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 13, n. 13, p. 4353–4358, 2005.

FREITAS A.E; BETTIO L.E.B; NEIS V.B; SANTOS D.B; RIBEIRO C.M; ROSA P.B; FARINA M; RODRIGUES A.L.S. Agmatine abolishes restraint stress-induced depressive-like behavior and hippocampal antioxidant imbalance in mice. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry** v.50, p. 143–50, 2014.

FRITSCH P, DE SAINT BLANQUAT G, DERACHE R. Gastrointestinal absorption in the rat of anisole, trans-anethole, butylhydroxyanisole and safrole. **Food Cosmet Toxicol.** v. 13, n. 3, p. 359 – 63, 1975.

GAGAN BN CHAINY, *et al.* Anethole blocks both early and late cellular responses transduced by tumor necrosis factor: Effect on NF-kB, AP-1, JNK, MAPKK and apoptosis. **Oncogene**, v. 19, p. 2943 - 2950, 2000.

GALICKA, A.; KRĘTOWSKI, R.; NAZARUK, J.; CECHOWSKA-PASKO, M. Anethole prevents hydrogen peroxide-induced apoptosis and collagen metabolism alterations in human skin fibroblasts. **Mol Cell Biochem.** v. 394, n. 1-2, p. 217 – 24, 2014.

GIBSON, Sara A.; KORADE, Željka; SHELTON, Richard C. Estresse oxidativo e resposta à glutatona em culturas de tecidos de pessoas com depressão maior. **Journal of psychiatric research**, v. 46, n. 10, p. 1326-1332, 2012.

GONCHAROVA, N. D. Stress responsiveness of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis: age-related features of the vasopressinergic regulation. **Frontiers in endocrinology**, v. 4, n. 26., 2013.

GOMES, Flávia Carvalho Alcantara; TORTELLI, Vanessa Pereira; DINIZ, Luan. Glia: dos velhos conceitos às novas funções de hoje e as que ainda virão. **Estud. av.**, São Paulo, v. 27, n. 77, p. 61-84, 2013.

GOLDSTEIN, E. Bruce. **Sensation and perception.** Cengage Learning, 2009.

GOULD, E.; MCEWEN, B. S.; TANAPAT, P.; GALEA, L. A. M.; FUCHS, E. Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult tree shrew is regulated by psychosocial stress and NMDA receptor activation. **J Neurosci**, v. 17, p. 2492-8, 1997.

GOTLIB, I. H; JOORMANN J. “Cognition and Depression: Current Status and Future Directions.” *Annual review of clinical psychology*, v. 6, p. 285–312, 2010.

GU G; ZHANG Z; WANG G; HAN F; HAN L; WANG K; LIU J; LI W. Effects of electroacupuncture pretreatment on inflammatory response and acute kidney injury in endotoxaemic rats. *J Int Med Res.*, v. 39, n. 5, p.1783-97, 2011.

HALL, J. E. 1946- **Tratado de fisiologia médica** / John E. Hall. - 13. ed. - Rio de Janeiro : Elsevier, 2017.

HALIWELL, B. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *J Neurochem*, v. 97, p. 1634-58, 2006.

HAN CUI *et al.* Clinical Study on Electro-acupuncture Treatment for 30 Cases of Mental Depression. *Journal of Traditional Chinese Medicine*, v. 172, n. 24 (3), p. 172-176, 2004.

HAN, Yao-Guo *et al.* Electroacupuncture prevents cognitive impairment induced by lipopolysaccharide via inhibition of oxidative stress and neuroinflammation. *Neuroscience letters*, v. 683, p. 190-195, 2018.

HAN, C.; LIM, Y. H.; HONG, Y. C. The Association Between Oxidative Stress and Depressive Symptom Scores in Elderly Population: A Repeated Panel Study. *Journal of Preventive Medicine and Public Health*, v. 49, n. 5, p. 260-274, 2016.

HERBERT, J; GOODYER, I. M; GROSSMAN, A. B; HASTINGS, M. H; DE KLOET, E. R; LIGHTMAN, S. L; SECKL, J. R. Do corticosteroids damage the brain? *Journal of neuroendocrinology*, v. 18, n. 6, p. 393-411, 2006.

HOLMES, A.; WELLMAN, C. L. Stress-induced prefrontal reorganization and executive dysfunction in rodents. *Neurosci biobehav rev.*, v. 33, n. 6, p. 773–783, 2009.

HONG, J. P. **Acupuntura: de terapia alternativa a especialidade médica.** *São Paulo: Centro de Estudos Integrado de Medicina Chinesa*, p192,2005.

HUANG, X. *et al.* “Depression and Chronic Liver Diseases: Are There Shared Underlying Mechanisms” *Frontiers in molecular neuroscience* v. 10, p. 134, 2017.

HUBER, P.C; ALMEIDA, Wanda P.; FATIMA, Ângelo de. Glutathione e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. *Quím. Nova*, São Paulo , v. 31, n. 5, p. 1170-1179, 2008.

HWANG, Y.C.; LIMEHOUSE, J.B. SHOEN, A.M. **Acupuntura veterinária. Da arte antiga à medicina moderna.** 2.ed. São Paulo: Roca, 2006. p.122-146.

IDELCHIK, M. del P. S.; BEGLEY, U.; BEGLEY, T. J.; MELENDEZ, J. A. Mitochondrial ROS control of cancer. *Seminars in Cancer Biology*, n. 2016, p. 0–1, 2016.

IN KOO HWANG *et al.*, Effects of Electroacupuncture at Zusanli and Baihui on Brain-Derived Neurotrophic Factor and Cyclic AMP Response Element-Binding Protein in the Hippocampal Dentate Gyrus. *J. Vet. Med. Sci.* v.72, n.11, p. 1431–1436, 2010.

- ITOIGAWA, M.; ITO, C.; TOKUDA, H.; ENJO, F.; NISHINO, H.; FURUKAWA, H. Cancer chemopreventive activity of phenylpropanoids and phytoquinoids from *Illicium* plants. **Cancer Letters**, v. 214, n. 2, p. 165–169, 2004.
- JANG, M.-H., K; HA, G.-J. JOO; N. TAKAMURA. Toxin production of cyanobacteria is increased by exposure to zooplankton. **Freshw. Biol.** v. 48, p. 1540–1550, 2003.
- JENNER, P. M.; HAGAN, E.C.; JEAN, M.; TAYLOR, E.L.; COOK, O.G.; FITZHUGH. Food flavourings and compounds of related structure. I. Acute oral toxicity, **Food Cosmet. Toxicol.** v. 2, n. 3, p. 327 – 343, 1964.
- JIA, HONG-MEI *et al.* “Chronic unpredictable mild stress leads to altered hepatic metabolic profile and gene expression.” **Scientific reports** v. 6, p. 234-41, 2016.
- JIN, Lisha *et al.* Dehydrocorydaline induced antidepressant-like effect in a chronic unpredictable mild stress mouse model via inhibiting uptake-2 monoamine transporters. **European journal of pharmacology**, v. 864, p. 172725, 2019.
- JOELS, M; BARAM, T. The neuro-symphony of estress. **Nat Rev Neurosci**, v. 10, p. 459-66, 2009.
- JUNMEI WU, MD *et al.* Acupuncture for Depression: A Review of Clinical Applications. **The Canadian Journal of Psychiatry**, v. 57, n 7, July 2012.
- JUNG, J.Y. *et al.* “Non-Alcoholic Fatty Liver Disease and Its Association with Depression in Korean General Population.” **Journal of Korean medical science** v. 34, n. 30, p. 199, 2019.
- JURUENA, Mario F; CLEARE, Anthony J; PARIANTE, Carmine M. O eixo hipotálamo-pituitária-adrenal, a função dos receptores de glicocorticóides e sua importância na depressão. **Rev. Bras. Psiquiatr.**, São Paulo , v. 26, n. 3, p. 189-201, Sept. 2004.
- JURUENA, M. F. Early-life stress and HPA axis trigger recurrent adulthood depression. **Epilepsy & Behavior: E&B**, v. 38, p. 148-59, 2014.
- KANG, P.; KIM, K.Y.; LEE, H.S.; MIN, S.S.; SEOL, G.H. Anti-inflammatory effects of anethole in lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice. **Life Sci.** v. 95, n. 24, p. 955 – 61, 2013.
- KERN, N; SHELDRIK, A.J; SCHMIDT, F.M; MINKWITZ, J. Neusobiology of depression and novel antidepressant drug target. **Current pharmaceutical design**, v. 18 , n. 36, p. 5791-5801, 2012.
- KHAN, A.; AHMAD, A.; AKHTAR, F.; YOUSUF, S.; XESS, I.; KHAN, L. A.; MANZOOR, N. Induction of oxidative stress as a possible mechanism of the antifungal action of three phenylpropanoids. **FEMS Yeast Research**, v. 11, n. 1, p. 114–122, 2011.
- KIM T.H; JUNG S.H; CHO K.H. Interlinked mutual inhibitory positive feedbacks induce robust cellular memory effects. **FEBS Lett.**, v. 16, n. 581(25), p. 4899-904, 2007.

KIM U.K; JORGENSON E; COON H; LEPPERT M; RISCH N; DRAYNA D Positional cloning of the human quantitative trait locus underlying taste sensitivity to phenylthiocarbamide. **Science**, v. 299, p. 1221–1225, 2003.

KIRBY L.G; LUCKI I. The effect of repeated exposure to forced swimming on extracellular levels of 5-hydroxytryptamine in the rat. **Stress**, v. 2, p. 251–263, 1998.

KHAN, Amjad A.; ALSAHLI, Mohammed A.; RAHMANI, Arshad H. Myeloperoxidase as an active disease biomarker: recent biochemical and pathological perspectives. **Medical Sciences**, v. 6, n. 2, p. 33, 2018.

KLAUMANN, Paulo Roberto; WOUK, A. F. P. F.; SILLAS, Thiago. Patofisiologia da dor. **Archives of veterinary science**, v. 13, n. 1, 2008.

KLOET, E. R.; JOELS, M.; HOLSBOER, F. Stress and the brain: from adaptation to disease. **Nat Rev Neurosci**, v. 6, p. 463-75, 2005.

KOCHAR B, BARNES EL, LONG MD, *et al.* Depression Is Associated With More Aggressive Inflammatory Bowel Disease. **The American Journal of Gastroenterology** v.113, n. 1, p.80-85, 2018.

KONKLE A.T.M; BAKER S.L; KENTNE A.C; BARBAGALLO L.S.M; MERALI Z; BIELAJEW C. Evaluation of the effects of chronic mild stressors on hedonic and physiological responses. *Brain Res*, 992: 227-238, 2003.

KOLLA, N.; WEI, Z.; RICHARDSON, J. S.; LI, X. M. Amitriptyline and fluoxetine protect PC12 cells from cell death induced by hydrogen peroxide. **J Psychiatry Neurosci**, v. 30, p.196-201, 2005.

KORKINA, L.; KOSTYUK, V.; DE LUCA, C.; PASTORE, S. Plant Phenylpropanoids as Emerging Anti-Inflammatory Agents. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 11, n. 10, p. 823–835, 2011.

KORKINA, L. G. Phenylpropanoids as naturally occurring antioxidants: From plant defense to human health. **Cellular and Molecular Biology**, v. 53, n. 1, p. 15–25, 2007.

KOOLHAAS, J. M; BARTOLOMUCCI, A; BUWALDA, B. D; DE BOER, S. F; FLÜGGE, G; KORTE, S. M.; RICHTER-LEVIN, G. Stress revisited: a critical evaluation of the stress concept. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 35, n. 5, p. 1291-1301, 2011.

KUMAR B; KUHAD A; CHOPRA K. Neuropsychopharmacological effect of sesamol in unpredictable chronic mild stress model of depression: behavioral and biochemical evidences. **Psychopharmacology** v. 214, p. 819–28, 2011.

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

KURKIN, V. A. (2003). Phenylpropanoids from medicinal plants: distribution, classification, structural analysis, and biological activity. **Chemistry of natural compounds**, 39(2), 123-153.

LAGE, Jorge Teixeira. **Neurobiologia da depressão**, 2011.

LE BOURHIS, B. Preliminary research in the metabolism of trans-anethole. **Annales Biologique Clinique**. v.26, p. 711 – 715, 1968.

LE BOURHIS, B.; SOENEN, A. M. Recherches sur l'action psychotrope de quelques substancias aromatiques utiliseés en alimentation. **Food Cosmet. Toxicol.** v. 11, n. 1 p. 1 - 9, 1973.

LEONARD B; MAES M. Mechanistic explanations how cell-mediated immune activation, inflammation and oxidative and nitrosative stress pathways and their sequels and concomitants play a role in the pathophysiology of unipolar depression. **Neurosci Biobehav Ver.**, v. 36, p. 764–785, 2012.

LESCH, K. P. . Gene–environment interaction and the genetics of depression. **Journal of Psychiatry and Neuroscience**, v.29, n. 3, p. 174, 2004.

LIGUORI, I. *et al.* Oxidative stress, aging, and diseases. **Clinical Interventions in Aging**, v. 13, p. 757-772, 2018

LUSHCHAK, V. I. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. **Chemico-biological Interactions**, v. 224, p. 164-75, 2014.

LLESUY, S.F. Introducci3n y Esp3cies Activas de Oxig3nio. In: MARRONI, N. P. (org.). EstresseOxidativo e Antioxidantes. **Canoas: Ed. ULBRA**, p. 21-32, 2002.

LIMA, A. A. G. **Estudo da correla3o entre n3veis s3ricos de citocinas (IL-1B , IL-6, IL-18BP, IL-33 e TNF-a) e da mieloperoxidase com o grau de obstru3o coronariano em pacientes com hip3tese diagn3stica de doen3a isqu3mica do mioc3rdio**. Tese (Doutorado em Farmacologia) - Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Cear3, Fortaleza, 2012.

LEE, Chieh-Hsin; GIULIANI, Fabrizio. The role of inflammation in depression and fatigue. **Frontiers in immunology**, v. 10, p. 1696, 2019.

LEE, Min-Ju et al. Effects of acupuncture on chronic stress-induced depression-like behavior and its central neural mechanism. **Frontiers in psychology**, v. 10, p. 1353, 2019.

LI, Weidong et al. Electroacupuncture relieves depression-like symptoms in rats exposed to chronic unpredictable mild stress by activating ERK signaling pathway. **Neuroscience letters**, v. 642, p. 43-50, 2017.

LI, XM, CHLAN-FOURNEY, J.; JUORIO, A. V.; BENNET, V. L.; SHRIKHANDE, S.; BOWEN, R. C. Antidepressants upregulate messenger RNA levels of the neuroprotective enzyme superoxide dismutase (SOD1). **J Psychiatry Neurosci**, v. 25, p. 43-7, 2000.

LIU, D.; XIE, K.; YANG, X.; GU, J.; GE, L.; WANDG, X. *et al.* Resveratrol reverses the effects of chronic unpredictable mild stress on behavior, serum corticosterone levels and BDNF expression in rats. **Behav Brain Res**, v. 264, p. 9-16, 2014.

LIU, C. Z; YU, J. C; ZHANG, X. Z; FU, W. W; WANG, T; HAN, J. X. Acupuncture prevents cognitive deficits and oxidative stress in cerebral multi-infarction rats. **Neurosci. Lett.**, v. 393, n. 1, p. 45-50, 2006.

LIU, Zhihua et al. Malondialdehyde: a novel predictive biomarker for post-stroke depression. **Journal of affective disorders**, v. 220, p. 95-101, 2017.

LOUVEAU, A. et al. Structural and functional features of central nervous system lymphatic vessels. **Nature**, London, v. 523, n. 7560, p. 337-341, jul. 2015.

LÓPEZ, AL López et al. Chronic Unpredictable Mild Stress Progressively Disturbs Glucose Metabolism and Appetite Hormones In Rats. **Acta Endocrinologica (Bucharest)**, v. 14, n. 1, p. 16, 2018.

LU, Jun et al. Potential antiinflammatory effects of acupuncture in a chronic stress model of depression in rats. **Neuroscience Letters**, v. 618, p. 31-38, 2016.

LUAN, Xiaoqian et al. Association between serum malondialdehyde levels and depression during early methamphetamine withdrawal. **Neuroscience letters**, v. 687, p. 22-25, 2018.

MACIOCIA, G. **Os Fundamentos da Medicina Chinesa: um Texto Abrangente para Acupunturistas e Fitoterapeutas**. 1a Ed., São Paulo: Roca, 1996.

MACQUEEN, G. M.; CAMPBELL, S.; MCEWEN, B. S.; MACDONALD, K.; AMANO, S.; JOFFE, R. T. *et al.* Course of illness, hippocampal function, and hippocampal volume in major depression. **Proc Natl Acad Sci**, v. 100, p. 1387-92, 2003.

MAES M; GALECKI P; CHANG Y.S; BERK M. A review on the oxidative and nitrosative stress (O&NS) pathways in major depression and their possible contribution to the (neuro)degenerative processes in that illness. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 29, n. 35(3), p. 676-92, April/2011.

MAKKAR, H. P. S; FRANCIS, G; BECKER, K. Bioactivity of phytochemicals in some lesser-known plants and their effects and potential applications in livestock and aquaculture production systems. **Animal**, v. 1, n. 9, p. 1371-1391, 2007.

MALYNN, S., CAMPOS-TORRES, A., MOYNAGH, P. ET al. The Pro-inflammatory Cytokine TNF- $\alpha$  Regulates the Activity and Expression of the Serotonin Transporter (SERT) in Astrocytes. **Neurochem**, v. 38, p. 694–704, 2013.

MALYKHIN, N. V; COUPLAND, N. J. Hippocampal neuroplasticity in major depressive disorder. **Neuroscience**, v. 309, p. 200-213, 2015.

MARTINS, E.I; GARCIA, E.G. **Pontos de acupuntura: Guia Ilustrado de Referência.**, 1ª Ed. Roca LTDA, São Paulo, 2003.

MARZZNI, S. H. S. **Parâmetros relacionado a depressão em animais adultos submetidos à ativação imune neonatal**. Dissertação (Mestrado) – universidade do Sul de Santa Catarina, Pós- graduação em ciências da Saúde, 2018.

MATTHEWS, Keith; FORBES, Naida; REID, Ian C. Sucrose consumption as an hedonic measure following chronic unpredictable mild stress. **Physiology & behavior**, v. 57, n. 2, p. 241-248, 1995.

MATT, S.M., GASKILL, P.J. Where Is Dopamine and how do Immune Cells See it?: Dopamine-Mediated Immune Cell Function in Health and Disease. **J Neuroimmune Pharmacol**, 2019.

MEDEIROS, A. A; MATOS, R. P. C. A depressão como posição subjetiva: contribuições lacanianas. **Revista Mal-estar e Subjetividade**, v. 18, n. 2, 2018.

MILLER, A. H., MALETIC, V., & RAISON, C. L. Inflammation and its discontents: the role of cytokines in the pathophysiology of major depression. **Biological psychiatry**, 65(9), 732-741. 2009.

MELZACK, R; WALL, P.D. Pain Mechanisms. **New Theory Science**, v. 150, p. 971-979, 1965.

MELSZACK R, STILLWELL D M, FOX E J Trigger points and acupuncture points for pain: correlations and implications. **Pain**, v. 3, p. 3-23, 1977.

MIYAGAWA, M.; SATOU, T.; YUKIMUNE, C.; ISHIBASHI, A.; SEIMIYA, H.; YAMADA, H.; HASEGAWA, T.; KOIKE, K. Anxiolytic-like effect of *Illicium verum* fruit oil, trans-anethole and related compounds in mice. **Phytother Res**. v. 28, n. 11, p. 1710 – 2, 2014.

MORAIS, M. L. G. S. **Efeitos da suplementação de anetol ou robinina na vitrificação e incubação in vitro do tecido ovariano ovino**. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2018.

MORADI, J.; ABBASIPOUR, F.; ZARINGHALAM, J.; MALEKI, B.; ZIAEE, N.; KHODADOUSTAN, A.; JANAHMADI, M. Anethole, a Medicinal Plant Compound, Decreases the Production of Pro-Inflammatory TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  in a Rat Model of LPS-Induced Periodontitis. **Iran J Pharm Res**. v. 13, n. 4, p. 1319 – 25, 2014

MOURA, C. M. C. **Atividade citoprotetora da berberina, um alcalóide isoquinolínico, sobre a toxicidade induzida pela 6-hidroxdopamina (6-OHDA) em células SH-SY5Y**. 95 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2012.

MRAZEK D.A; HORNBERGER, J.C; ALTAR, C.A; DEGTIAR, I. Uma revisão da carga clínica, econômica e social da depressão resistente ao tratamento: 1996–2013. **Psychiatr. Serv.**, v. 65, n. 8, p. 977 – 987, 2014.

NARDI A. E. Transtorno de Ansiedade Social. Fobia Social - A Timidez Patológica. **MEDSI**, Rio de Janeiro, 2000.

NATUME, P. S. **O efeito antinociceptivo induzido pela acupuntura em ratos depende de mecanismos dopaminérgicos na substância cinzenta periaquedutal**. Trabalho de Conclusão de Curso – Ciências biológicas (Bacharel em Biologia), Universidade Federal do paraná, 2017.

NEHER, Jonas J. et al. Phagocytosis executes delayed neuronal death after focal brain ischemia. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 43, p. E4098-E4107, 2013.

NEMEROFF C.B. Prevalence and management of treatment-resistant depression. **J Clin Psychiatry** **68 Supp**, v. 8, p. 17-25, 2007.

NESTLER, E. J; BARROT, M; DILEONE, R. J; EISCH, A. J; GOLD, S. J; MONTEGGIA, L. M. Neurobiology of depression. **Neuron**, v. 34, n. 1, p. 13-25, 2002.

NEWBERNE, R.; SMITH, R.L.; DOULL, J.; GOODMAN, J.I.; MUNRO, I.C.; PORTOGHESE, P.S.; WAGNER, B.M.; WEIL, C.S.; WOODS, L.A.; ADAMS, T.B.; LUCAS, C.D.; FORD, R.A. The FEMA GRAS assessment of trans-anethole used as a flavoring substance. **Fd Chem Toxicol**. v. 37, p. 789 - 811, 1999.

OAKES, Ken D .; VAN DER KRAAK, Glen J. Utilidade do teste TBARS na detecção de estresse oxidativo em populações de ventosas brancas (*Catostomus commersoni*) expostas a efluentes de fábricas de celulose. **Aquatic Toxicology** , v. 63, n. 4, p. 447-463, 2003.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAUDE (OMS). **Depression**. Fact sheet n° 369, October 2012.

OLIVEIRA F.L.C. *et al.* **Efeitos psicofisiológicos do estresse em trabalhadores**. Caderno de Graduação-Ciências Humanas e Sociais-UNIT-ALAGOAS, v. 5, n. 2, p. 93, 2019.

OLIVEIRA, A.C.F. **Estresse moderado crônico: efeitos sobre a atividade geral em ratos**. Tese (Doutorado em Ciências do Comportamento) - Departamento de Processos Psicológicos Básicos, Universidade de Brasília, Brasília, 2009.

PAGLIARONE, Ana Carolina; SFORCIN, José Maurício. Estresse: revisão sobre seus efeitos no sistema imunológico. **Biosaúde**, v. 11, n. 1, p. 57-90, 2016.

PAKNEJAD, M. *et al.* Analysis of aspartate aminotransferase and alkaline phosphatase in crevicular fluid from implants with and without peri-implantitis. **Implant dentistry**, v. 15, n. 1, p. 62-69, 2006.

PAL, Rishi et al. Estudos farmacológicos e bioquímicos sobre o papel dos radicais livres durante a imunomodulação induzida por estresse em ratos. **International immunopharmacology** , v. 11, n. 11, p. 1680-1684, 2011.

PALLAVI, P; SAGAR, R; MEHTA, M; SHARMA, S; SUBRAMANIAM, A; SHAMSHI, F; MUKHOPADHYAY, A. K. . Serum neurotrophic factors in adolescent depression: gender difference and correlation with clinical severity. **Journal of affective disorders**, v. 150, n. 2, p. 415-423, 2013.

PALTA, P; SAMUEL, L. J; MILLER III, E. R.; SZANTON, S. L. . Depression and oxidative stress: results from a meta-analysis of observational studies. **Psychosomatic medicine**, v. 76, n. 1, p. 12, 2014.

PANAGIOTAKOPOULOU, Vasiliki et al. Anti-neuroinflammatory, protective effects of the synthetic microneurotrophin BNN-20 in the advanced dopaminergic neurodegeneration of “weaver” mice. **Neuropharmacology**, p. 107919, 2019.

PARK, Ji-Yeun; NAMGUNG, Uk. Electroacupuncture therapy in inflammation regulation: current perspectives. **Journal of inflammation research**, v. 11, p. 227, 2018.

PANZER, R. A comparison of the traditional Chinese vs. transpositional Zangfu Organ Association acupoint locations in the horse. **Am. J. Chinese Med.**, v. 21, p. 119-131, 1993.

PAOLO, S. D.; BRAIN, Paul; WILLNER, Paul. Effects of chronic mild stress on performance in behavioural tests relevant to anxiety and depression. **Physiology & behavior**, v. 56, n. 5, p. 861-867, 1994.

PARIANTE, C. M; LIGHTMAN, S. L. The HPA axis in major depression: classical theories and new developments. **Trends in neurosciences**, v. 31, n. 9, p. 464-468, 2008.

PEDRAZZOLI, Matteo *et al.* Glucocorticoid receptors modulate dendritic spine plasticity and microglia activity in an animal model of Alzheimer's disease. **Neurobiology of Disease**, v. 132, p. 104568, 2019.

PENG, Q; MASUDA, N; FORD, E; DUAN, W; TRYGGESTAD, E; LADENHEIM, B; *et al.* Sertraline slows disease progression and increases neurogenesis in N171-82Q mouse model of Huntington's disease. **Neurobiol. Dis.** 30, 312–322, 2008.

PEREIRA, Joedna Cavalcante *et al.* SISTEMA NERVOSO E ENDÓCRINO: UMA INTEGRAÇÃO QUE MANTÉM A VIDA. **Revista InterSaúde**, v. 1, n. 1, p. 22-36, 2019.

PEREIRA, Mafalda Costa; RIBEIRO, Laura. Stresse, Catecolaminas e Risco Cardiovascular. **Arq Med**, Porto , v. 26, n. 6, p. 245-253, dez. 2012.

PERVEEN, Tahira *et al.* O tratamento com óleo de funcho imita os efeitos antidepressivos e ansiolíticos da fluoxetina sem alterar os níveis séricos de colesterol em ratos. **Paquistão Journal of Zoology**, v. 49, n. 6, 2017.

POCOCK, Jennifer M.; KETTENMANN, Helmut. Receptores de neurotransmissores na microglia. **Tendências em neurociências**, v. 30, n. 10, p. 527-535, 2007. PONTE, E.L.; SOUSA, P.L.; ROCHA, M.V.A.P.; SOARES, P.M.G.; COELHO-DE-SOUZA, A.N.; LEAL-CARDOSO, J.H.; ASSREUY, A.M.S. Comparative study of the anti-edematogenic effects of anethole and estragole. **Pharmacol. Rep.** v.4, p. 984 - 990, 2012.

PONTE, E.L. **Efeito anti-inflamatório do trans-anetol e o envolvimento de mediadores inflamatórios derivados de macrófagos.** Tese (Doutorado em Ciências Biológicas - Fisiologia) - Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2015.

PORSOLT, R. D., LePICHON, M., JALFRE, M. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. **Nature**, London, v. 266, n. 5604, p. 730- 32, 1977.

POSSAMAI, F. **Teste do nado forçado repetido: avaliação dos efeitos da imipramina sobre o comportamento e a neurogênese hipocampal dos ratos alojados em ambiente**

**enriquecido.** Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de Santa Catarina, 2013.

POST, Ryan J.; WARDEN, Melissa R. Melancholy, anhedonia, apathy: the search for separable behaviors and neural circuits in depression. **Current opinion in neurobiology**, v. 49, p. 192-200, 2018.

PRAGADHEESH, V. S., SAROJ, A., YADAV, A., CHANOTIYA, C. S., ALAM, M; SAMAD, A. Chemical characterization and antifungal activity of Cinnamomum camphora essential oil. **Industrial crops and products**, v. 49, p. 628-633, 2013.

PRYOR, W. The antioxidant nutrients and disease prevention— what, do we know and what, do we need to find out? **Am J Clin Nutr**. v. 53, p. 391S–393S, 1991.

RAISON C.L; BORISOV A.S; BROADWELL S.D; CAPURON L; WOOLWINE B.J; JACOBSON I.M. Depression during pegylated interferon-alpha plus ribavirin therapy: prevalence and prediction. **J Clin Psychiatry**, v. 66, p. 41–48, 2005.

RAY, R. S.; KATYAL, Anju. Myeloperoxidase: bridging the gap in neurodegeneration. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 68, p. 611-620, 2016.

RAZZOUK, D. Por que o Brasil deveria priorizar o tratamento da depressão na alocação dos recursos da Saúde? **Epidemiol. Serv. Saúde**, v. 25, n. 4, 2016.

REDROBE, J.P; BOURIN, M. Partial role of 5-HT<sub>2</sub> and 5-HT<sub>3</sub> receptors in the activity of antidepressants in the mouse forced swimming test. **Eur J Pharmacol**, v. 325, p. 129–35, 1997.

RITTER, A.M.; DOMICIANO, T.P.; VERRI, W.A. JR.; ZARPELON, A.C.; DA SILVA, L.G.; BARBOSA, C.P.; NATALI, M.R.; CUMAN, R.K.; BERSANI-AMADO, C.A. Antihypernociceptive activity of anethole in experimental inflammatory pain. **Inflammopharmacology**. v. 21, n. 2, p.187 – 197, 2013.

RODRIGUES, M. B. **Interações entre o chronic mild stress e o desempenho operante:** uma replicação de Dolabela. (Dissertação de mestrado). Programa de estudos Pós-graduados em Psicologia Experimental: Análise do comportamento, Pontifícia Universidade Católica de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil. Samson, H. H., Pfeffer, A., 2005.

ROBACZEWSKA, ; KEDZIORA-KORNATOWSKA, K; KOZAKIEWICZ, M; ZARYSIKORSKA, E; PAWLUK, H; PAWLISZAK, W; KEDZIORA, J. Role of glutathione metabolism and glutathione- related antioxidant defense systems in hypertension. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 67, n. 3, p. 331–337, 2016.

ROMAN, R.M; WENDLAND, A. E; POLANCZYK, C. A. Mieloperoxidase e doença arterial coronariana: da pesquisa à prática clínica. **Arq. Bras. Cardiol.**, São Paulo , v. 91, n. 1, p. e12-e19, July/2008.

ROVER JÚNIOR, L; HÖEHR, N.F; VELLASCO, A.P. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutatona associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. **Quim. Nova**, v. 24, n.1, p.112-119, 2001.

ROSS, J. **Combinações dos pontos de acupuntura: a chave para o êxito clínico.** Roca, São Paulo, 2003.

RYU, Sangwoo et al. Trans-anethole protects cortical neuronal cells against oxygen–glucose deprivation/reoxygenation. **Neurological Sciences**, v. 35, n. 10, p. 1541-1547, 2014.

SAIJO, K; GLASS, C. K. . Microglial cell origin and phenotypes in health and disease. **Nat. Rev. Immunol.** V. 11, p. 775–787, 2011.

SÁNCHEZ-VIOQUE, R; POLISSIOU, M; ASTRAKA, K; DE LOS MOZOS-PASCUAL, M; TARANTILIS, P; HERRAIZ-PENALVER, D; SANTANA-MÉRIDAS, O. Polyphenol composition and antioxidant and metal chelating activities of the solid residues from the essential oil industry. **Industrial crops and products**, v. 49, p. 150-159., 2013.

SÁ, N. A. R.; ARAÚJO, V. R.; CORREIA, H. H. V.; FERREIRA, A. C. A.; GUERREIRO, D. D.; SAMPAIO, A. M.; ESCOBAR, E.; SANTOS, F. W.; MOURA, A. A.; LÔBO, C. H.; CECCATTO, V. M.; CAMPELLO, C. C.; RODRIGUES, A. P. R.; LEAL-CARDOSO, J. H.; FIGUEIREDO, J. R. Anethole improves the in vitro development of isolated caprine secondary follicles. **Theriogenology**, v. 89, p. 226–234, 2017.

SANTOS, B. Efeito da acupuntura no tratamento de animais com sequelas neurológicas decorrentes de cinomose. 2013.

SANTOS, Elba Lúcia Wanderley dos. **Efeitos da acupuntura, eletroacupuntura e metformina sobre o estresse oxidativo, inflamação e glicemia em ratas sadias submetidas a estímulo estrogênico.** 2012. 105 f. Dissertação (Mestrado em Cirurgia) - Universidade Federal do Ceará. Faculdade de Medicina, Fortaleza, 2012.

SCHUCH, N.JS; HENTSCHKE, G. S.; COLPO, E.; MORAES, C. M. B. **Relação entre estresse oxidativo e depressão em mulheres idosas da cidade de Santa Maria/RS** Dissertação (Mestrado em Mestrado em Ciências da Vida e da Saúde) - Universidade Franciscana– Santa Maria, 2019.

SEDLAK, J; LINDSAY, R. H. Estimation of Total Protein-Bound, and Nonprotein Sulfhydryl Groups in Tissue with Ellman’s Reagent. **Analytical Biochemistry**, v. 25, p.1192-1205, 1968.

SHANG, Huajie et al. Effects of electroacupuncture on cognitive function in vascular cognitive impairment rats. **International Journal of Traditional Chinese Medicine**, v. 40, n. 5, p. 427-431, 2018.

SELEK, Salih et al. Oxidative markers of Myeloperoxidase and Catalase and their diagnostic performance in bipolar disorder. **Journal of affective disorders**, v. 181, p. 92-95, 2015.

SILVA, E. Efeitos do estresse crônico em áreas do cérebro. **Revista Eletrônica da Estácio Recife**, v. 1, n. 1, 2015.

SILVA, Agamenon Honório. Efeitos da acupuntura e da eletroacupuntura sobre o estresse oxidativo em ratos saudáveis. 2009. 75 f. Dissertação (Mestrado em Cirurgia) - Universidade Federal do Ceará. Faculdade de Medicina, Fortaleza, 2010.

SIQUEIRA, Luciana Domett et al. **Estudo dos mecanismos de déficit cognitivo associado ao envelhecimento: o papel da resposta inflamatória**. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular), Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2016.

SIU, F. K; LO, S. C; LEUNG, M. C. Electro-acupuncture potentiates the disulphide-reducing activities of thioredoxin system by increasing thioredoxin expression in ischemia-reperfused rat brains. **Life Sciences**, v. 77, n. 4, p. 386-99, jun./2005.

SMITH, L.L. Acute inflammation: the underlying mechanism in delayed onset muscle soreness? **Medicine Science in Sports and Exercise, Madison**, v.23, p.542-51, 1991.

SOHLHEIM, E; SCHELIN, R.R. Metabolism of alkenylbenzene derivatives in the rats. II. Eugenol and isoeugenol methyl esters. **Xenobiotica**. v. 6, p. 137 – 150, 1976.

SOUZA, I. B. M. B. **Depressão experimental induzida pela administração única e repetida de dexametasona em camundongos**: ferramenta para estudo do potencial antidepressivo de antagonistas NOP / Ingrid Brasilino Montenegro Bento de Souza. - Natal, 2018.

SOUZA, Camila e MOREIRA, Virginia. Tristeza, depressão e suicídio melancólico: a relação com o Outro. **Arq. bras. psicol.** [online]., v.70, n.2 , pp. 173-185, 2018.

SOUZA, Leandra Andréia de *et al.* Acupuntura no Sistema Único de Saúde—uma análise nos diferentes instrumentos de gestão. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 22, p. 301-310, 2017.

SOUTHWICK, S. M; VYTHILINGAM, M; CHARNEY, D. S. The psychobiology of depression and resilience to stress: implications for prevention and treatment. **Annu. Rev. Clin. Psychol.**, v. 1, p. 255-291, 2005.

STADNICK, Tainá Delfino. Estudos dos ativos cosméticos vegetais de uso profissional utilizados no envelhecimento facial. **Tecnologia em Cosmetologia e Estética-Tubarão**, 2019.

KALYNCHUK, L. E; STERNER, E. Y. Behavioral and neurobiological consequences of prolonged glucocorticoid exposure in rats: Relevance to depression. **Progress in NeuroPsychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 34, n. 5, p. 777–790, 2010.

STREKALOVA *et al.*. Update in the methodology of the chronic stress paradigm: internal control matters **Behavioral and Brain Functions**, v. , p. 9, 2011.

STREKALOVA T; SPANAGEL R; BARTSCH D; HENN F.A; GASS P. Stress-induced anhedonia in mice is associated with deficits in forced swimming and exploration. **Neuropsychopharmacology**, v. 29, n. 11, p. 2007-17, Nov/2004.

SURDEA-BLAGA T; DUMITRAȘCU, D.L. Depressão e ansiedade em esteatohepatite não-alcoólica: existe alguma associação? **Rom J Intern Med.** ,v. 49, n. 4 , p. 273-80, 2011.

SWAAB, D. F; BAO, A. M; LUCASSEN, P. J. The stress system in the human brain in depression and neurodegeneration. **Ageing research reviews**, v. 4, n. 2, p. 141-194, 2005.

SZABÓ, Márcia Valéria Rizzo Scognamillo; BECHARA, Gervásio Henrique. Acupuntura: bases científicas e aplicações. **Ciência rural**, v. 31, n. 6, p. 1091-1099, 2001.

TAFFAREL, M. O; FREITAS, P. M. C. Acupuntura e analgesia: aplicações clínicas e principais acupontos. **Cienc. Rural**, Santa Maria, v. 39, n. 9, p. 2665-2672, Dec. 2009.

TANNENBAUM B; TANNENBAUM G.S; SUDOM K; ANISMAN H. Neurochemical and behavioral alterations elicited by a chronic intermittent stressor regimen: implications for allostatic load. **Brain Res**, v. 25, n. 953 (1-2), p. 82-92, 2002.

TEIXEIRA, F. M. **Avaliação Comparativa do Efeito de Fármacos Antiinflamatórios com a Acupuntura no Modelo de Dor Pós-incisional em Ratos**. Originalmente apresentada como dissertação de mestrado da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica/RJ, 2010.

THIERRY, B., STERU, L., CHERMAT, R., SIMON, P. Searching-waiting strategy: a candidate for an evolutionary model of depression? **Behav. Neural. Biol.**, San Diego, v. 41, n. 2, 180-189, 1984.

TIMMERMANS, W; XIONG, H; HOOGENRAAD, C. C; KRUGERS, H. J. Stress and excitatory synapses: from health to disease. **Neuroscience**, v. 248, p. 626-636, 2013.

TOMANARI, G.Y; PINE, A.I.S; SILVA, M. T. A. Ratos wistar sob regimes rotineiros de restrição hídrica e alimentar. **Rev. bras. ter. comport. cogn.**, São Paulo, v. 5, n. 1, p. 57-71, jun. 2003.

TRIVEDI M.H; FAVA M; WISNIEWSKI S.R; THASE M.E; QUITKIN F; WARDEN D; RITZ L; NIERENBERG A.A; LEBOWITZ B.D; BIGGS M.M; LUTHER J.F; SHORES-. Medication augmentation after the failure of SSRIs for depression. **New England Journal of Medicine**, v. 354, n. 12, p. 1243-1252, 2006.

TSIGOS, C.; CHROUSOS, G. P. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, neuroendocrine factors, and stress. **J Psychosom Res**, v. 53, p. 865-71, 2002.

ULRICH-LAI, Y. M; HERMAN, J. Neural regulation of endocrine and autonomic stress response. **Nat Rev Neurosci**, v. 10, p. 307-409, 2009.

VALKO M; LEIBFRITZ D; MONCOL J; CRONIN M.T.D; MAZUR M; TELSER J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human diseases. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 39, p. 44-84, 2007.

VASCONCELOS, T. B. de *et al.* Radicais livres e antioxidantes: proteção ou perigo? UNOPAR Científica. **Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 16, n. 3, p. 213-219, 2014.

VÁSQUEZ, B. *et al.* "Effects of early and late adverse experiences on morphological characteristics of Sprague-Dawley rat liver subjected to stress during adulthood." **International journal of clinical and experimental pathology** v. 7, n.8, p. 4627-35, 2014.

VISMARI, L.; ALVES, G. J.; PALERMO-NETO, J. Depressão, antidepressivos e sistema imune: um novo olhar sobre um velho problema. **Revista de Psiquiatria Clínica**, v. 35, 2008.

XU, Bin *et al.* Microglia Activated by Excess Cortisol Induce HMGB1 Acetylation and Neuroinflammation in the Hippocampal DG Region of Mice Following Cold Exposure. **Biomolecules**, v. 9, n. 9, p. 426, 2019.

XUE, R. *et al.* “Peripheral Dopamine Controlled by Gut Microbes Inhibits Invariant Natural Killer T Cell-Mediated Hepatitis.” **Frontiers in immunology** vol. 9 p. 2398, 2018.

WANG, S-M.; KAIN, Z.N.; WHITE, P. Acupuncture Analgesia: I. The Scientific Basis. **Anesthesia and Analgesia**, v. 106, p. 602-610, 2008.

WANG, Hua *et al.* Effects of total glucosides of peony on immunological hepatic fibrosis in rats. **World Journal of Gastroenterology: WJG**, v. 11, n. 14, p. 2124, 2005.

WEN, Tom Sintan. **Acupuntura clássica chinesa**. Editora Cultrix, 1985.

WIIZLER, L.A.M.; SILVA-COMAR, F.M.S.; SILVA-FILHO, S.E.; OLIVEIRA, M.J.A.; BERSANI-AMADO, C.A., CUMAN, R.K.N. Evaluation of immunomodulatory activity of trans-anethole and estragole, and protective effect against cyclophosphamide-induced suppression of immunity in Swiss albino mice. **IJARNP**. v. 8, n. 1, p. 26 – 33, 2015.

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

WILLNER P; MUSCAT R; PAPP M. Chronic mild stress-induced anhedonia: a realistic animal model of depression. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, 16, 525–534, 1992.

WILLNER, P; SCHEEL-KRÜGER, J; & BELZUNG, C. The neurobiology of depression and antidepressant action. **Neuroscience & biobehavioral reviews**, v. 37, n. 10, p. 2331-2371, 2013.

WILLNER, P; TOWER, D; SAMPSON, S; SOPHOKLEOUS S; MUSCAT, R. Reduction of sucrose preference by chronic unpredictable mild stress, and its restoring by a tricyclic antidepressant. **Psychopharmacology**, v. 93, p.358-364, 1987.

WILLNER P. Validity, reliability and utility of the chronic mild stress model of depression: a 10-year review and evaluation. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 134, n. 4, p. 319-29, dec/1997.

WILSON K; RUSH A.J. Medication augmentation after the failure of SSRIs for depression. **N Engl J Med.**, v. 23, n. 354(12), p. 1243-52, Mar /2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Tradicional Medicine Strategy 2014–2023** Geneva: WHO; 2013.

YAMAMURA, Y; NAKANO, M. A. Y. **Livro Dourado da Acupuntura em Dermatologia e Estética**. 1a ed 2a Reimp, São Paulo: Ed. Center AO, 2010.

YANG, L; Zhu, X; HAN, Q; LIU Q; Yu J; Wu G. Electroacupuncture upregulates ERK signaling pathways and promotes adult hippocampal neural progenitors proliferation in a rat model of depression. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v.13, p.288, 2013.

YANG, Jin Le et al. O PDTC alivia os sintomas depressivos e a lesão do tecido do cólon através da inibição da superprodução de NO em ratos CUMS. **Fronteiras em Neurociência** , v. 13, p. 1327, 2019.

YANG, Jian *et al.* Enhanced antidepressant-like effects of electroacupuncture combined with citalopram in a rat model of depression. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, 2013.

YANG, Y. et al. A proteômica revela desregulação metabólica da energia e da glutatona no córtex pré-frontal de um modelo de depressão em ratos. **Neurociência** , v. 247, p. 191-200, 2013.

YOUSSEF, N.A; ABDELMALEK, M.F; BINKS, M; GUY, C.D; OMENETTI, A; SMITH, A.D; DIEHL, A.M; SUZUKI, A. Associations of depression, anxiety and antidepressants with histological severity of nonalcoholic fatty liver disease. **Liver Int.** v.33, n.7, p.1062-70, 2013.

YUN-KYOUNG, Y; HYUN, L; KWON-EUI, H; YOUNG-IL, K; BYUNG-RYUL, L; TAE-HAN, K; JI-YOUNG, Y. Hepatoprotective effect of manual acupuncture at acupointGB34 against CCl4-induced chronic liver damage in rats. **World J. Gastroenterol.**,v. 12, n.14, p. 2245-9, 2006.

YU, S; HOLSBOER, F; ALMEIDA, O. F. X. Neuronal actions of glucocorticoids: Focus on depression. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 108, n. 3-5, p. 300-309, 2008.

ZHANG, Jialing et al. Electroacupuncture Improves Antidepressant Effects in CUMS Rats by Protecting Hippocampal Synapse and Mitochondrion: An Ultrastructural and iTRAQ Proteomic Study. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2019, 2019.

ZHAO, Z-Q. Neural mechanism underlying acupuncture analgesia. **Progress in Neurobiology**, v. 85, p. 355-375, 2008.

## APÊNDICES E ANEXOS

### APÊNDICE A - APROVAÇÃO NO COMITÊ DE ÉTICA PARA USO DE ANIMAIS (CEUA)



Universidade Federal do Ceará  
 Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA  
 Rua: Coronel Nunes de Melo, 1127 Rodolfo Teófilo  
 Cep: 60430-970 Fortaleza-CE

#### CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "PRE E POS-CONDICIONAMENTO COM SERTRALINA, CURCUMINA, E ELETROACUPUNTURA EM MODELO DE RATOS SADIOS SUBMETIDOS AO ESTRSSSE MODERADO CRÔNICO", protocolo nº21/2016, sob responsabilidade do Prof. Dr. Sergio Botelho Guimarães, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei 11.794, de nº8 de outubro de 2008, do Decreto 6899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-UFC) da Universidade Federal do Ceará, em reunião em 26 de março de 2016.

Vigência do projeto	01/04/2016 a 01/04/2020
Espécie/Linhagem	Rato heterogênico Wistar
Nº de Animais	48
Peso/Idade	150-200g 8 a 10 semanas
Sexo	Machos
Origem	Biotério Central da UFC

Fortaleza, 26 de março de 2016

  
 Prof. Dr. Rodrigo Siqueira  
 Coordenador do CEUA - UFC

  
**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
 RODRIGO JOSÉ BEZERRA DE SIQUEIRA  
 COORDENADOR DA COMISSÃO DE ÉTICA E DO USO COM  
 ANIMAIS - CEUA/UFC - Matrícula Siape: 1520734

**APÊNDICE B – PROTOCOLO OPERACIONAL PADRÃO**

<b>ATIVIDADE: MANUTENÇÃO DOS ANIMAIS/ TROCÂNCIA</b>	TEMPO: 30 min	Nº: 20
---	---------------	--------

<b>MATERIAL NECESSÁRIO</b>	<b>QTD</b>
- Caneta de marcação permanente	04
- Ração (proveniente do biotério)	-
- Maravalha (proveniente do biotério)	-
- Caixas grandes (proveniente do biotério)	08
- Garrafas (proveniente do biotério)	16
- Tampa de gaiola (proveniente do biotério)	08
- Balança (proveniente do biotério)	01
- Vasilha para balança (proveniente do biotério)	01
- Esparadrapo	01
- Papeis/ plásticos identificadores	08

<b>ANTES DA ATIVIDADE</b>
- Checar identificação dos grupos

<b>DESCRIÇÃO DO PROCESSO:</b>
- Manutenção dos animais ocorrem as segundas e quintas. Consiste na troca das caixas, ração, maravalha e água. Identificar na água o dia, hora e responsável que realizou o processo.
- Realizar a remarcação dos animais: usar uma cor de caneta para cada grupo (ex.: azul – Grupo 01; Preto – Grupo 02; Vermelho – Grupo 03; verde - Grupo 04)
- Valores de 1 a 4 e 6 a 9 tem marcação com listras no rabo, de acordo com a numeração. Valores 5 e 10 tem uma marcação contínua de aproximadamente 04 dedos de comprimento, e 2 marcações de 4 dedos de comprimento, respectivamente.

<b>APÓS A ATIVIDADE</b>
- Realizar pesagem e anotar
- Anotar atividades realizadas na sessão Acompanhamento Diário com horário de início e fim. Assinar.
- Comunicar aos demais integrantes sobre realização da atividade.

<b>ATIVIDADE: ESTRESSE CRÔNICO MODERADO</b>	TEMPO: 30 min	Nº : 42
---	---------------	---------

<b>MATERIAL NECESSÁRIO</b>	<b>QTD</b>
- Caixas e tampas pequena destinadas a comundongos (proveniente do biotério)	08
- Maravalha (proveniente do biotério)	-
- Ração (proveniente do biotério)	-
- Garrafa de água (proveniente do biotério)	16

<b>ANTES DA ATIVIDADE</b>
- Anotar horário de início e cronometrar retirada
- Checar identificação dos grupos
- Realizar pesagem e anotar
- Avisar técnicos para não retirem o estressor, deixar recado na gaiola.

<b>DESCRIÇÃO DO PROCESSO:</b>
O processo será composto por 5 tipos de estressores dispostos continuamente por 42 dias de acordo com o cronograma randomizado (Apêndice C)
<b>Habitação Úmida (HU) por 8 horas:</b> Consiste na disposição de aproximadamente 400ml de água sobre as maravalhas, de modo a deixa-las úmidas/encharcadas. Porém não deve ter quantidade excedente de água, que seja possível a visualização de nível de água.
<b>Espaço Restrito (ER) por 2 horas:</b> Consiste na disposição dos animais em caixas de camundongo. Uma caixa para cada 5/6 animais. <b>Observação:</b> Colocar garrafas de água em nível máximo sobre as tampas das gaiolas como estratégia para evitar escapes, pois as gaiolas são mais leves.
<b>Inclinação da Gaiola (IG) por 4 horas:</b> Consiste na inclinação da gaiola dos animais em um ângulo de aproximadamente 30° a 45° graus. Isso pode ser feito com o auxílio de uma tampa/grade de gaiola.
<b>Jejum hídrico (JH) por 17, 19 e 20 horas em momentos distintos não sequenciais:</b> Consiste na retirada da garrafa de água. Atenção: os horários de disposição do jejum deve ser alternado com outro estressor, seguindo o cronograma (Apêndice C)
<b>Privação de alimento (PA) por 19, 24 e 43 horas em momentos distintos não sequenciais:</b> Consiste na retirada da ração. Seguindo o cronograma. Atenção: os horários de disposição do jejum deve ser alternado com outro estressor, seguindo o cronograma (Apêndice C)

<b>Atenção:</b> Ao horário das Atividades Experimentais do biotério da Unichristus (7:30-16:00). Flexibilizações nos horários são possíveis desde que não ultrapassem 30 minutos. É importante, ainda, chegar no biotério com antecedência e avisar previamente para sinalizar aos técnicos que haverá atividade.
---

<b>APÓS A ATIVIDADE</b>
- Anotar atividade na sessão Acompanhamento diário
- Avisar ao grupo de pesquisa as atividades realizadas

<b>ATIVIDADE: TESTES DE PREFERENCIA A SACAROSE</b>	<b>TEMPO: 1:30</b>	<b>Nº: 4</b>
--	--------------------	--------------

<b>MATERIAL NECESSÁRIO</b>	<b>QTD</b>
- Tubos com sacarose	70
- Tubo da tampa azul vazio	1
- Balança de precisão (lab 8°)	1
- Esparadrapo	1
- Garrafas pequenas (proveniente do biotério)	9

<b>ANTES DA ATIVIDADE</b>
<b>Com 48h de antecedência – Preparo:</b> Realizar pesagem diária. Fazer o processo idêntico ao teste (ver descrição do procedimento), dispor as garrafas de forma inversa ao que vai ser apresentado no dia do teste (Preparo: sacarose ao Lado Esquerdo), em exposição por 24 horas. Realizar pesagem das garrafas antes e depois. <b>Tempo dispendido para atividade: 1 hora.</b>
<b>Com 24h de antecedência:</b> Pesar animais. Dispor os animais em jejum hídrico e de alimento por 23 horas. <b>Tempo dispendido para atividade: 40 min.</b>
<b>No dia:</b> Checar identificação dos grupos, realizar pesagem e anotar. Cronometrar horário de início e fim da atividade

<b>DESCRIÇÃO DO PROCESSO:</b>
<b>Laboratório 8° andar:</b> Fazer a pesagem da sacarose. A sacarose estará disposta para cada teste em Tubos de Tampa Azul, previamente pesados e designados para cada dia do teste. Porém é importante refazer a pesagem no dia que será realizado. O tubo de tampa Azul tem peso de 2,0 g. Tarar com tubo vazio. Só depois fazer a medição. <b>O peso da sacarose 1 grama.</b>
<b>Biotério:</b> Separar 8 garrafas pequenas. Encher com água potável em temperatura ambiente. Tarar a balança onde se pesa os animais com uma garrafa vazia (fazer esse processo a cada garrafa). Pesar todas as garrafas com água. O peso deve estar com 100g de água. Levar todas as garrafas contendo apenas água para a sala de comportamento. Identificar com esparadrapo a garrafa que conterà sacarose e só depois despejar o tubo de sacarose nos tubos já preenchidos por água. Distribuir os animais em superfície plana. Alocar as garrafas a de sacarose a DIREITA e a de água a esquerda. Ter cuidado ao dispor a garrafa para não desperdiçar as soluções. <b>Observação:</b> aceitando-se que 1g= 1ml, o que mantém a proporção de 1 g de sacarose em 100 ml de água (1%).

<b>APÓS A ATIVIDADE</b>
- Realizar pesagem garrafa e anotar seu peso <b>Obs:</b> sempre tarar a balança entre uma garrafa e outra, com uma garrafa vazia.
- Anotar atividades realizadas na sessão Comportamento <b>Obs:</b> Caso haja intercorrências é importante relatar na mesma sessão, no espaço reservado a observações.
- Avisar ao grupo de pesquisa as atividades realizadas
- Acondicionar animais de acordo com a atividade do dia (Estressor ou Tratamento) de acordo com o cronograma

<b>ATIVIDADE: TRATAMENTO -ELETROACUPUNTURA</b>	<b>TEMPO: 6 h</b>	<b>Nº: 6</b>
--	-------------------	--------------

<b>MATERIAL NECESSÁRIO</b>	<b>QTD</b>
- Agulhas de acupuntura descartáveis (3 pontos)	400
- Eletroestimulador e cabo de força	1
- Cabo com 2 saídas	2
- Redes	6
- Suporte para redes	2
- Esparadrapo	1
- Bateria quadrada	5

#### **ANTES DA ATIVIDADE**

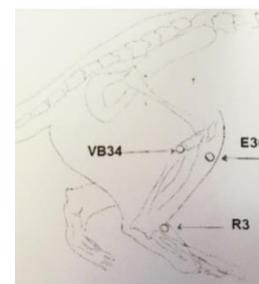
- **Período de aclimação:** 3 dias antes do início do tratamento realizar adaptação dos animais as redes, por períodos crescentes a cada dia de 5 , 7 e 10 min na rede com as 4 patas presas com esparadrapo, promovendo a liberação das patas ao longo dos dias de acordo com a adaptação dos animais. Deixando, prioritariamente, a pata direita posterior presa.

- Checar identificação dos grupos que receberam este tratamento, realizar pesagem e anotar

#### **DESCRIÇÃO DO PROCESSO:**

**Colocação nas Redes:** Acondicionar os animais com as patas nos furos, deixando o furo maior para a pata traseira direita. A pegada dos animais deve ser próximo as patas dianteiras de modo que possam ser guiadas. Prender as patas dianteiras e traseira com esparadrapo. Passar primeiro o esparadrapo na pata dando uma volta (Atenção a integridade da pele e circulação da região). Na pata que houver a eletroestimulação deve-se colocar o esparadrapo antes do início dos pelos.

**Eletroacupuntura:** Aplicar a agulha de acupuntura nos pontos indicados na foto (E-36 localizado abaixo da cabeça fíbula no tubérculo anterior, VB-34 localizado na depressão anterior e inferior da fíbula, R-3 localizado na depressão entre o maléolo medial e o tendão do calcâneo). Usar o aplicador para ajudar a posicionar a agulha. Após tirar o aplicador, verificou que agulha está mal colocada, pode fazer uma pequena pressão de modo a sentir traspasar a derme. **Obs:** Ter cuidado na aplicação do ponto R3 para não traspasar a agulha. Ligar o eletroestimulador (ligar/desligar), posicionar os eletrodos nos pontos VB34 e E36. Pressionar Iniciar/Parar. Ajustar a intensidade em 1,0. Fazer isso nos dois lados do aparelho. Visualizar o pulso. Sinal de que está tudo OK. Ao terminar os 15 minutos o aparelho acionará um bipe. **Obs:** Aparelho ajustado na função J (pré-configurado).



#### **APÓS A ATIVIDADE**

- Retirar eletrodos, retirar agulhas, descartar em recipiente adequado

- Deixar animais em repouso com água e ração a vontade

- Anotar atividades realizadas na sessão Acompanhamento Diário. **Obs:** Caso haja intercorrências é importante relatar na mesma sessão, no espaço reservado a observações.

- Avisar ao grupo de pesquisa as atividades realizadas

<b>ATIVIDADE: TRATAMENTO COM ANETOL</b>	<b>TEMPO: 1:30</b>	<b>Nº: 6</b>
---	--------------------	--------------

<b>MATERIAL NECESSÁRIO</b>	<b>QTD</b>
- Anetol (proveniente da Universidade Estadual do Ceará - UECE)	1
- Tween (proveniente da Universidade Estadual do Ceará - UECE)	1
- Agua destilada (proveniente do Laboratório 8 - Unichristus)	1
- Ponteira de 1000ul — azul (proveniente do Laboratório 8 - Unichristus)	12
- Ponteira p/ 50 ul - amarela (proveniente do Laboratório 8 - Unichristus)	12
- Pipeta de 100 a 1000 ul (proveniente do Laboratório 8 - Unichristus)	1
- Pipeta de 50 ul (proveniente do Laboratório 8 - Unichristus)	1
- Tubo de ensaio (proveniente do Laboratório 8 - Unichristus)	2
- Béquer pequeno (proveniente do Laboratório 8 - Unichristus)	1
- Agitador (proveniente do Laboratório 8 - Unichristus)	1
- Parafilme (proveniente do Laboratório 8 - Unichristus)	6
- Seringa de insulina	6
- Cânula de Gavagem (proveniente do Biótério - Unichristus)	1
- Estante para tubo de ensaio (proveniente do Laboratório 8 - Unichristus)	1

#### **ANTES DA ATIVIDADE**

##### **PREPARO DO TRANS-ANETOL (LABORATÓRIO 8 - UNICHRISTUS):**

**Cálculo do Trans-anetol:** Para calcular o peso total dos animais: - Cada animal no experimento irá pesar entre 150 e 250 g. — Fazendo o cálculo para 200 g por animal teremos: 22 animais (aqueles que receberam este tratamento) x 250 g = 5500 g (Peso total).

**Calcular concentração de 1,0 mg/kg:** 100 g (de animal) — 100 ul (de solução)

$$5500 \text{ g (peso total)} \text{---} X \text{ ul (de solução)}$$

$$X = \mathbf{5500 \text{ ul de solução.}}$$

Para a concentração de 1,0 mg/kg:

$$1 \text{ mg (de soluto) ----- } 1000 \text{ g (peso de animal)}$$

$$Y \text{ ----- } 5500 \text{ g (peso total)}$$

$$Y = \mathbf{5,5 \text{ mg de soluto} = 5,5 \text{ ul de soluto.}}$$

TWEEN – Diluente = 10ul TWEEN + 9.990ul de H2O (d).

Dessa Forma: Tendo em vista que a densidade = 0,98; podemos considerar que 1 kg = 1L.

**1º PASSO:** 9.990ul de H2O (d) + 10ul de TWEEN 80 (Parafilm e agitador).

**2º PASSO:** 5.500ul de TWEEN 80.

**3º PASSO:** 5,5ul (Anetol) e dispensar na solução de TWEEN 80.

**4º PASSO:** Colocar o tubo com a solução no agitador.

**Explicação desse processo de modo simplificado:** Colocar agua destilada no béquer. Pegar com a pipeta de 1000ul e ponteira azul, coletar agua destilada por 10x, colocando no tubo de ensaio. Pegar pipeta de 50ul. E ponteira amarela. Gira a pipeta até a numeração de 10ul. Pegar o tween. Esperar o tween subir. Despeja o tween nas bordas do tubo de ensaio próximo

a solução de água destilada. Tampar com parafilme. Leva ao agitador do tipo Vortex®. Esperar fazer “redemoinho”. Sinalizar o tubo de Tween. Pega a solução de tween e água destilada que foi ao vortex, com a pipeta de 100 a 1000ul (pode reutilizar a primeira ponteira azul) retira 5 x + roda a pipeta e ajusta até 500 1x a solução de tween e coloca no 2º tubo de ensaio. Totalizando 5.500ul. Com a pipeta de 50ul (pegar nova ponteira amarela), colocar entre 5 e 6, pega o Trans-anetol. Coloca ao centro da solução. Após isso, suga um pouco da solução deste tubo de ensaio e solta, por 3x, para aproveitar toda a solução de Trans-anetol da ponteira. Leva ao Vortex® até fazer “redemoinho”. Levar tubo de ensaio e estante de apoio de tubo de ensaio para o biotério, lembrando de devolver ao final do experimento do dia.

**Obs<sup>1</sup>:** Ao final acondicionar tween e anetol e geladeira.

**Obs<sup>2</sup>:** Dia de domingo – prepara dois tubos de ensaio no sábado. Leva para acondicionar no freezer do biotério. Avisar devolução dos materiais do Laboratório na segunda.

**Biotério:** Checar identificação dos grupos que receberam tratamento, realizar pesagem e anotar. Levar animais para sala de comportamento. Acoplar cânula de gavagem a seringa de 1 mL.

#### **DESCRIÇÃO DO PROCESSO:**

Realizar a aspiração de anetol segundo o peso de cada animal por dia. Realiza a pega do animal ou pela pelagem próximo as aurículas ou pelo pescoço. Segura o rabo com os dedos distais da mesma mão. Com a mão dominante pega a seringa, coloca a cânula pela lateral da boca do animal, introduz cânula quase por completo, Com o dedo polegar empurra-se o embolo. Observar a ingestão da substância e vitalidade do animal pós administração.

#### **APÓS A ATIVIDADE**

- Deixar animais em repouso com água e alimento a vontade

- Anotar atividades realizadas na sessão Acompanhamento Diário. **Obs:** Caso haja intercorrências é importante relatar na mesma sessão, no espaço reservado a observações.

- Avisar ao grupo de pesquisa as atividades realizadas

<b>ATIVIDADE: MANEJO DO GRUPO CONTROLE – SALINA E REDE</b>	TEMPO: 1 h	Nº: 6
--	------------	-------

<b>MATERIAL NECESSÁRIO</b>	<b>QTD</b>
- Soro fisiológico	1
- agulha 40x12	1
- Seringa de insulina	6
- Rede	2
- Suporte	1
- Cânula de gavagem	1
- Esparadrapo	1

#### **ANTES DA ATIVIDADE**

**Período de aclimação:** 3 dias antes do início do tratamento realizar adaptação dos animais as redes, por períodos crescentes a cada dia de 5 , 7 e 10 min na rede com as 4 patas presas com esparadrapo, promovendo a liberação das patas ao longo dos dias de acordo com a adaptação dos animais. Deixando, prioritariamente, a pata direita posterior presa.

Checar identificação dos grupos para essa atividade, realizar pesagem e anotar

#### **DESCRIÇÃO DO PROCESSO:**

Realizar a aspiração de salina segundo o peso de cada animal por dia. Realiza a pega do animal ou pela pelagem próximo as aurículas ou pelo pescoço. Segura o rabo com os dedos distais da mesma mão. Com a mão dominante pega a seringa, coloca a cânula pela lateral da boca do animal, introduz cânula quase por completo, Com o dedo polegar empurra-se o embolo. Observar a ingestão da substância e vitalidade do animal pós administração.

- Dispor os animais na rede.

#### **APÓS A ATIVIDADE**

- Deixar animais em repouso com água e alimento a vontade

- Anotar atividades realizadas na sessão Acompanhamento Diário. **Obs:** Caso haja intercorrências é importante relatar na mesma sessão, no espaço reservado a observações.

- Avisar ao grupo de pesquisa as atividades realizadas

<b>ATIVIDADE: COLETA</b>	<b>TEMPO: 6 h</b>	<b>Nº: 1</b>
--------------------------	-------------------	--------------

<b>MATERIAL NECESSÁRIO</b>	<b>QTD</b>
- Heparina	2
- Xilazina	4
- Ketamina	4
-Ependoff	200
- Agulha 25x0,7	70
-Seringa de 5ml	50
-Seringa de insulina	16
-Agulha de insulina	50
- Estante de isopor	4
- Lâmina de Bisturir	20
- Instrumental cirúrgico	4
- Balança Portatil	1
- Pinça dente de rato.	1
- Freezer a -70 ou nitrogênio líquido	1
- Centrifuga para eppendorf	1
- Pipeta de 50	2
- Ponteira de 50ul	50

#### **ANTES DA ATIVIDADE**

- Checar identificação dos grupos para essa atividade, realizar pesagem e anotar.
- Identificar todos os ependoffs. Cada animal deve ter 3 tubos. 1 Para o sangue(1) 1 para o soro(2) 1 para o fígado(3). Ex: Animal 1 do grupo controle: na tampa 1 para sangue e GIR1 na lateral. Deixar enfileirado em estantes de esopor.
- Heparinizar eppendorf e seringas que receberão sangue.

#### **DESCRIÇÃO DO PROCESSO:**

**ANESTÉSICO:** Para cada animal de 150g aspira-se de Ketamina e de Xilazina (de acordo com ), com seringa de insulina, intraperitoneal no quadrante inferior esquerdo ventralmente.

**CIRÚRGICO:** Após sedado, é feita uma incisão vertical seguida por uma horizontal com tesoura cirúrgica ou bisturi na linha media nos quadrantes inferiores.

**COLETA DE SANGUE:** Afasta-se os órgãos para visualizar a aorta. A agulha 25x0,7 deve ser inclinada. Punciona-se com o bisel para cima. Aspira imediatamente com a seringa de 5 ml heparinizada. Coloca-se no eppendorf e homogeneiza por 1 min.

**COLETA DE FÍGADO:** Imediatamente depois da retirada do sangue retira fígado. Retira fígado. Separa lóbulos. Pesar e anotar. E coloca no ependoff. Coloca no freeze – 70 ou no nitrogênio.

**SEPARAÇÃO DO SANGUE: Cetrifugação:** programação de rotação de . Colocar eppendorf de modo contralateral para balancear. **Pipetagem** soro e colocar em ependoff separado.

**EUTANÁSIA**

- Realizar eutanásia por meio de guilhotinamento cervical. Embalar em saco branco leitoso entregar aos técnicos de laboratório para descarte adequado.

**APÓS A ATIVIDADE**

- Verificar anotações sobre peso dos animais, peso do fígado. E outras observações.

- Anotar atividades realizadas na sessão Coleta

### APÊNDICE C – CRONOGRAMA DOS ESTRESSORES

<b>Estressor</b>						<b>DIA 01</b>
						12-PA por 43h
<b>Estressor</b>	<b>DIA 03</b>	<b>DIA 04</b>	<b>DIA 05</b>	<b>DIA 06</b>	<b>DIA 07</b>	<b>DIA 08</b>
	7-IG por 4h 9-JH por 20h	7- HU por 8h 15 – JH por 19	10- IG por 4h 14- ER por 2h 16- JH por 17h	9- IG por 4h 13-PA por 19h	8h - IG por 4h 11h-PA por 24h	12-PA por 43h
<b>Estressor</b>	<b>DIA 10</b>	<b>DIA 11</b>	<b>DIA 12</b>	<b>DIA 13</b>	<b>DIA 14</b>	<b>DIA 15</b>
	7-IG por 4h 9-JH por 20h	7- HU por 8h 15 – JH por 19	10- IG por 4h 14- ER por 2h 16- JH por 17h	9- IG por 4h 13-PA por 19h	8h-HU por 8h 6h- PA por 20h	12-PA (43h)
<b>Estressor</b>	<b>DIA 17</b>	<b>DIA 18</b>	<b>DIA 19</b>	<b>DIA 20</b>	<b>DIA 21</b>	<b>DIA 22</b>
	07-HU por 8h 15- PA por 19h	10- ER por 2h 12-PA por 19h	8 –IG por 4h 12-PA por 43h	∅	13 - JH por 19h	8- IG por 4h 12-PA por 43h
<b>Estressor</b>	<b>DIA 24</b>	<b>DIA 25</b>	<b>DIA 26</b>	<b>DIA 27</b>	<b>DIA 28</b>	<b>DIA 29</b>
<b>Atividade</b>	07-HU por 8h 15-PA por 20h	10- ER por 2h 12-PA por 19h	8- HU por 8h 16 – JH por 17h	9 –ER por 2h 11- JH por 20h	7-HU por 8h 15-JH por 19h	10- ER por 2h 2 - PA por 43h
<b>Estressor</b>	<b>DIA 31</b>	<b>DIA 32</b>	<b>DIA 33</b>	<b>DIA 34</b>	<b>DIA 35</b>	<b>DIA 36</b>
	07- IG por 4h 11-JH por 20h	8- ER por 2h 12- JH por 19h	8 - IG por 4h 12- JH por 19h	07- PA por 24h	7h - HU por 8h 15- JH por 17h	10- ER por 2h 12-PA por 43h
<b>Estressor</b>	<b>DIA 38</b>	<b>DIA 39</b>	<b>DIA 40</b>	<b>DIA 41</b>	<b>DIA 42</b>	
	07- IG por 4h 11-JH por 20h	07- PA por 24h	07- IG por 4h 12 - PA por 43h	∅	07- ER por 2h	

Fonte: Dados da pesquisa. Onde PA- Privação de Alimento; JU – Jejum hídrico; IG – inclinação da gaiola; ER – Espaço restrito; HU- habitação úmida.

**APÊNDICE D – VALORES DOS ANESTÉSICO POR PESO**

<b>PESO (g)</b>	<b>Quetamina (ml)</b>	<b>Xilazina (ml)</b>
140	0,252	0,070
150	0,270	0,075
160	0,288	0,080
170	0,306	0,085
180	0,324	0,090
190	0,342	0,095
200	0,360	0,100
210	0,378	0,105
220	0,396	0,110
230	0,414	0,115
240	0,432	0,120
250	0,450	0,125
260	0,468	0,130
270	0,486	0,135
280	0,504	0,140

Fonte: Dados da pesquisa

**APÊNDICE E – PESO DOS ANIMAIS EM VALORES ABSOLUTOS**

<b>GRUPOS</b>	<b>Período 1: Dia 01 - 04</b>	<b>Período 2: Dia 05 - 43</b>	<b>Período 3: Dia 44 - 48</b>	<b>Período 4: Dia 49 - 59</b>
G1 - Salina	68,1	93,8	110,0	139,7
G2 – EAc 100Hz	116,9	128,5	141,3	170,9
G3 – Trans-anetol	171,3	172,0	160,6	193,1
G4 – EAc + Trans-anetol	232,7	224,2	216,8	246,0
Média	147,2	154,6	157,2	187,4

Fonte: Dados da pesquisa

**APÊNDICE G – RESULTADOS DA AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA EM VALORES ABSOLUTOS**

**Tabela 1 – Transaminase glutâmico oxalacética (TGO) (U/L)**

<b>Rato</b>	<b>G1 - Salina</b>	<b>G2 – EAc 100Hz</b>	<b>G3 – Trans-anetol</b>	<b>G4 - EAc 100 Hz + Trans-anetol</b>
<b>1</b>	88	97	119	88
<b>2</b>	77	85	*	104
<b>3</b>	67	136	58	58
<b>4</b>	107	137	114	44
<b>5</b>	70	85	90	53
<b>6</b>	*	81	59	37
<b>7</b>	82	90	24	34
<b>8</b>	82	111	65	75
<b>9</b>	72	92	107	39
<b>10</b>	65	83	77	27
<b>11</b>	**	**	112	27

Fonte: Dados da pesquisa. \* Morte do animal no decorrer dos estressores. \*\* Grupos contendo apenas 10 animais pela distribuição randômica considerando os eventos mais estressores.

**Tabela 2 – Transaminase glutâmico pirúvica (TGP) (U/L)**

<b>Rato</b>	<b>G1 - Salina</b>	<b>G2 – EAc 100Hz</b>	<b>G3 – Trans-anetol</b>	<b>G4 - EAc 100 Hz + Trans-anetol</b>
<b>1</b>	63	50	44	72
<b>2</b>	67	58	*	42
<b>3</b>	50	56	67	41
<b>4</b>	51	56	44	46
<b>5</b>	49	79	49	50
<b>6</b>	*	50	50	64
<b>7</b>	56	63	71	38
<b>8</b>	56	46	81	43
<b>9</b>	37	50	74	46
<b>10</b>	45	45	54	27
<b>11</b>	**	**	66	27

Fonte: Dados da pesquisa. \* Morte do animal no decorrer dos estressores. \*\* Grupos contendo apenas 10 animais pela distribuição randômica considerando os eventos mais estressores.

**Tabela 3 – Mieloperoxidase (MPO) (µg/g)**

<b>Rato</b>	<b>G1 - Salina</b>	<b>G2 – EAc 100Hz</b>	<b>G3 – Trans-anetol</b>	<b>G4 - EAc 100 Hz + Trans-anetol</b>
<b>1</b>	6,623	7,139	2,194	0,402
<b>2</b>	8,858	6,167	*	0,780
<b>3</b>	6,844	3,250	1,936	0,213
<b>4</b>	8,466	4,890	2,499	4,314

<b>5</b>	10,296	9,600	1,978	4,162
<b>6</b>	*	7,771	2,065	4,360
<b>7</b>	7,245	2,416	5,411	0,678
<b>8</b>	8,729	5,734	8,287	1,420
<b>9</b>	7,254	1,932	5,577	0,793
<b>10</b>	7,941	1,711	1,499	1,005
<b>11</b>	**	**	1,033	0,803

Fonte: Dados da pesquisa. \* Morte do animal no decorrer dos estressores. \*\* Grupos contendo apenas 10 animais pela distribuição randômica considerando os eventos mais estressores.

**Tabela 4 – Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) plasmático e hepático (µmol/L)**

Rato	G1 - Salina		G2 – EAc 100Hz		G3 – Trans-anetol		G4 - EAc 100 Hz + Trans-anetol	
	Plasma	Fígado	Plasma	Fígado	Plasma	Fígado	Plasma	Fígado
<b>1</b>	0,177	0,536	0,026	0,322	0,048	0,343	0,005	0,113
<b>2</b>	0,104	0,447	0,196	0,146	*	*	0,007	0,106
<b>3</b>	0,154	0,473	0,105	0,307	0,258	0,089	0,011	0,156
<b>4</b>	0,343	0,559	0,031	0,114	0,056	0,106	0,050	0,199
<b>5</b>	0,348	0,536	0,008	0,142	0,136	0,300	0,052	0,152
<b>6</b>	*	*	0,315	0,019	0,022	0,301	0,013	0,034
<b>7</b>	0,176	0,329	0,213	0,328	0,095	0,144	0,001	0,032
<b>8</b>	0,239	0,319	0,307	0,351	0,149	0,299	0,015	0,153
<b>9</b>	0,318	0,404	0,206	0,333	0,137	0,144	0,015	0,153
<b>10</b>	0,249	0,337	0,013	0,310	0,012	0,099	0,056	0,156
<b>11</b>	**	**	**	**	0,012	0,113	0,036	0,012

Fonte: Dados da pesquisa. \* Morte do animal no decorrer dos estressores. \*\* Grupos contendo apenas 10 animais pela distribuição randômica considerando os eventos mais estressores.

**Tabela 5 – Glutaciona reduzida (GSH) (µg/g)**

Rato	G1 - Salina		G2 – EAc 100Hz		G3 – Trans-anetol		G4 - EAc 100 Hz + Trans-anetol	
	Plasma	Fígado	Plasma	Fígado	Plasma	Fígado	Plasma	Fígado
<b>1</b>	60,503	161,565	95,36	196,424	173,58	274,638	200,23	301,295
<b>2</b>	63,139	164,202	127,58	228,647	*	*	200,82	301,880
<b>3</b>	61,382	162,444	95,36	196,424	145,45	246,516	237,73	338,790
<b>4</b>	63,725	164,787	102,10	203,162	147,80	248,859	201,11	302,173
<b>5</b>	78,958	180,020	94,78	195,838	123,78	224,839	200,82	301,880
<b>6</b>	*	*	105,32	206,384	129,64	195,545	206,97	308,032
<b>7</b>	69,291	170,353	115,28	187,050	148,09	222,788	227,77	328,830
<b>8</b>	66,362	167,424	104,74	205,798	135,79	222,788	229,82	330,881
<b>9</b>	65,190	166,252	109,42	210,485	148,38	249,445	235,97	337,032
<b>10</b>	64,897	165,959	100,63	201,697	124,07	225,132	229,82	330,881
<b>11</b>	**	**	**	**	127,29	228,354	208,43	309,497

Fonte: Dados da pesquisa. \* Morte do animal no decorrer dos estressores. \*\* Grupos contendo apenas 10 animais pela distribuição randômica considerando os eventos mais estressores.