



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA

TAYLA HERMÍNIO DE MORAIS

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIDEPRESSIVA DO FENILPROPANOIDE 2-
ALILFENOL EM CAMUNDONGOS SWISS SUBMETIDOS AO PROTOCOLO DE
ESTRESSE SUBCRÔNICO IMPREVISÍVEL**

JOÃO PESSOA - PARAÍBA

2018

TAYLA HERMÍNIO DE MORAIS

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIDEPRESSIVA DO FENILPROPANOIDE 2-
ALILFENOL EM CAMUNDONGOS SWISS SUBMETIDOS AO PROTOCOLO DE
ESTRESSE SUBCRÔNICO IMPREVISÍVEL**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Coordenação do Curso de
Graduação em Biotecnologia do Centro
de Biotecnologia da Universidade Federal
da Paraíba, como parte dos requisitos
para obtenção do grau de Bacharel em
Biotecnologia.

Orientadores: Prof^a Dr^a Mirian G. S. Stiebbe Salvadori
Prof. Dr. Rafael de Almeida Travassos

JOÃO PESSOA

2018

Catálogo na publicação
Seção de Catálogo e Classificação

M827a Moraes, Tayla Hermínio de.

Avaliação da atividade antidepressiva do fenilpropanoide 2-alilfenol em camundongos swiss submetidos ao protocolo de estresse subcrônico imprevisível / Tayla Hermínio de Moraes. - João Pessoa, 2018.

66 f. : il.

Orientação: Mirian G S Stiebbe Salvadori, Rafael de Almeida Travassos.

Monografia (Graduação) - UFPB/CBiotec.

1. Depressão. 2. 2-alilfenol. 3. Estresse Subcrônico Imprevisível. I. Salvadori, Mirian G S Stiebbe. II. Travassos, Rafael de Almeida. III. Título.

UFPB/BC



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA (UFPB)
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA (CBiotec)
CAMPUS I – JOÃO PESSOA/PB
Coordenação do Curso de Bacharelado em
Biotecnologia

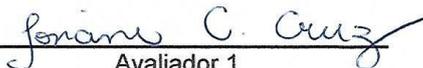


ATA DE DEFESA PÚBLICA DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Aos oito dias do mês de junho de 2018, às 10:00h, em sessão pública no auditório do Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos (IPeFarM) deste Campus Universitário, na presença da Banca Examinadora presidida pelo Professor Dr. Rafael de Almeida Travassos e composta pelos avaliadores 1. Profa. Dra. Josiane de Campos Cruz (CBIOTEC/UFPB); 2. Prof. Dr. Diogo Vilar da Fonseca (UNIVASF), a discente Tayla Herminio de Moraes, matrícula 11402046, apresentou o Trabalho de Conclusão de Curso intitulado: **Avaliação da atividade antidepressiva do fenilpropanoide 2-alilfenol**, como requisito curricular indispensável para a integralização do Curso de Graduação em Biotecnologia. Após reunião em sessão reservada, a Banca Examinadora deliberou e decidiu pela APROVAÇÃO do referido trabalho, divulgando o resultado formalmente a discente e demais presentes e eu, Rafael de Almeida Travassos, na qualidade de Presidente da Banca, lavrei a presente ata que será assinada por mim, pelos demais avaliadores e pela discente.



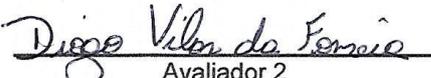
Presidente da Banca Examinadora



Avaliador 1



Discente



Avaliador 2

João Pessoa/PB, 08 de junho de 2018.

Dedico este trabalho a Deus e a minha família que sempre esteve ao meu lado, torcendo por minha vitória.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus por todas as dádivas que Ele me proporcionou, sempre colocando as pessoas certas no meu caminho e me trazendo consolo e aprendizado nos momentos difíceis.

A cada membro da minha família, mas em especial a minha mãe, Valdinez Hermínio, que sempre aturou minha ansiedade, me deu suporte durante cada experimento, vinha comigo para a UFPB nos finais de semana só para que eu não ficasse sozinha até o anoitecer e me ensina diariamente a ser uma mulher batalhadora e determinada, um grande exemplo de feminismo.

Aos meus amigos de escola Ana Rachel, Isabelle Santos, Nicolas Safadi, Kaio Ramalho e Mayne Dias, que, apesar de raramente ver, estão sempre no meu coração de gelo.

As gamofóbicas que a biotecnologia me deu, Anna Julyana, Albanisia e Viviane. Vamos torcer para dessa vez um slide não sumir. E espero vocês nessa vida de formada, se Deus quiser.

A minha família Vermelhorar e, em especial, aos meus irmãos Leonardo, Juliana e Larissa, bem como, pai Vinícius. Vocês são meu porto seguro.

Aos meus professores de ensino médio, principalmente aos professores de ensino médio Job Fonseca e Carmélia, responsáveis por me apresentar o amor pela biotecnologia e influenciarem diretamente a escolha da minha profissão.

A todos os professores que tive a honra de ser orientanda durante os 4 anos de graduação, se eu me tornei uma boa profissional foi porque cada um de vocês me moldou para tal.

Um agradecimento especial a professora Mírian, o maior exemplo de paciência, cuidado, dedicação e orientação que eu poderia ter. A senhora olha para todos do laboratório com olhos de mãe e esta sempre disposta a ajudar para que seus alunos cresçam. Obrigada por me receber de braços aberto, ter confiado tanto em mim e por sua orientação sensacional.

Por fim, mas não menos importante, aos meus companheiros de laboratórios Ikla, Alana, Érika, César, Aline e Poli e minha eterna gratidão aos colegas quase escravizados que tornaram este trabalho possível, Patrik, Kaíque, Rochelle, Yan, Vinícius e Gabrielly.

Mantém o teu coração firme e sê constante, inclina teu ouvido e acolhe as palavras inteligentes, e não te afobes no tempo da contrariedade.

Eclesiástico 2:2

RESUMO

O transtorno depressivo maior acomete milhões de pessoas a nível global, gerando intempéries não só para o indivíduo acometido, mas como o meio que o cerca. Esta doença é considerada multifatorial e por tal motivo pesquisas para desenvolvimento de fármacos que aliviem a sintomatologia ou tratem a doença gerando menos efeitos colaterais são fundamentais. Nessa lógica, várias linhas de pesquisas se voltam para procurar bioativos de origem natural que possam agir como possível antidepressivos. Um composto de origem natural que não se tem estudos sobre sua atividade antidepressiva é o 2-alilfenol, um fenilpropanoide que se mostrou efetivo na atividade antinociceptiva por meio da via glutamatérgica. Com base nesses dados, este trabalho se propôs a averiguar a atividade antidepressiva do 2-alilfenol nas doses de 50, 75 e 100 mg/kg (*i.p.*) no protocolo de estresse subcrônico imprevisível. Para tal, foram utilizados camundongos *Swiss* (*Mus musculus*) machos, com número de oito animais por grupo. Os animais foram aclimatizados no laboratório por cinco dias antes de iniciar a fase de aplicação de estressores por 14 dias, sendo aplicado de dois a quatro estressores diariamente. No 13º dia de protocolo, iniciou-se o tratamento com antidepressivo padrão, imipramina, ou com 2-alilfenol em doses predefinidas, sendo realizada triagem farmacológica comportamental a cada dois dias após início do tratamento. Ao final do protocolo foram realizados testes comportamentais de suspensão de cauda, borrifagem de sacarose e campo aberto para averiguar o comportamento do tipo depressivo. O protocolo de estresse aumentou o tempo de imobilidade e reduziu a latência para imobilidade no teste de suspensão de cauda, indicando comportamento do tipo depressivo. Enquanto que o tratamento com 2-alilfenol mostrou restauração no tempo de imobilidade e latência para imobilidade no teste de suspensão de cauda, aumentou o tempo de autolimpeza dos animais no teste de borrifagem de sacarose e melhorou a capacidade exploratória vista no teste de campo aberto, demonstrando assim atividade antidepressiva desse fenilpropanoide.

Palavras-chaves: Depressão, 2-alilfenol, Estresse Subcrônico Imprevisível.

ABSTRACT

The major depressive disorder affects millions of people globally, generating intempéries not only for the affected person, but as the environment that surrounds him. This disease is considered multifactorial and for this reason research for the development of drugs that alleviate the symptomatology or treat the disease generating fewer side effects are fundamental. In this logic, several lines of research are turned to look for naturally occurring bioactives that may act as possible antidepressants. A compound of natural origin that has no studies on its antidepressant activity is 2-allylphenol, a phenylpropanoid that has shown to be effective in antinociceptive activity through the glutamatergic pathway. Based on these data, this study aimed to investigate the antidepressant activity of 2-allylphenol at doses of 50, 75 and 100 mg / kg (i.p.) in the protocol of unpredictable subchronic stress. For this, Swiss mice (*Mus musculus*) were used, with eight animals per group. The animals were acclimatized in the laboratory for five days before starting the application phase of stressors for 14 days, being applied from two to four stressors daily. On the 13th day of the protocol, treatment with standard antidepressant, imipramine, or 2-allylphenol was started in predefined doses, and behavioral pharmacological screening was performed every two days after starting treatment. At the end of the protocol, behavioral tests of tail suspension, sucrose spraying and open field were performed to ascertain the behavior of the depressive type. The stress protocol increased the immobility time and reduced the latency for immobility in the tail suspension test, indicating behavior of the depressive type. While 2-allylphenol treatment showed immobility and immobility latency for immobility in the tail suspension test, it increased the self-cleaning time of animals in the sucrose spray test and improved the exploratory capacity seen in the open field test, thus demonstrating antidepressant activity of this phenylpropanoid.

Key words: Depression, 2-allylphenol, Subchronic Unpredictable Stress.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Classificação da depressão pelo CID-10 (A) e DSM-V (B)	16
Figura 2 - Números de casos de depressão maior por região.....	18
Figura 3 - Regulação pré-sináptica de neurônios serotoninérgicos, noradrenérgicos (e dopaminérgicos	19
Figura 4 - Regulação do Eixo HPA.....	21
Figura 5 - Relação entre atividade das citocinas pró-inflamatórias e eixo HPA	23
Figura 6 - Atividade das citocinas pró-inflamatórias no Sistema Nervoso Central.. ..	24
Figura 7 - Atuação de três classes farmacológicas de antidepressivos	25
Figura 8 - Substratos para atuação da monoaminoxidase	26
Figura 9 - Etapas identificadas no tratamento contra a depressão maior.	28
Figura 10- Estrutura bidimensional do fenilpropanoide 2-alilfenol.....	29
Figura 11- Linha do tempo do protocolo de estresse subcrônico imprevisível.	36
Figura 12 - Dados da análise ponderal ao decorrer do protocolo de estresse subcrônico imprevisível.	42
Figura 13 – Latência para imobilidade (A). Tempo de imobilidade (B).....	43
Figura 14 - Latência para groomin. Tempo de grooming (B).....	44
Figura 15 - Dados obtidos da análise do teste de campo aberto	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Comparação entre a prevalência para o transtorno depressivo maior em homens e mulheres.....	17
Tabela 2 - Modelos animais para implementação do comportamento do tipo depressivo.....	30
Tabela 3 - Diferentes medidas de validade.....	30
Tabela 4 - Estressores aplicados durante o período de estresse subcrônico imprevisível com suas respectivas descrições.....	36

LISTA DE ABREVIATURA, SIGLAS E SÍMBOLO

ACTH	Hormônio adrenocorticotrófico
BH4	Tetrahydrobiopterina
CID	Código Internacional de Doenças
Cm	Centímetros
CRF/CRH	Hormônio/fator liberador de corticotrofina
DA	Dopamina
DSM	Manual de Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais
h	Hora
HPA/HHA	Eixo hipotálamo-hipófise-adrenal
iMAO	Inibidores da Monoaminoxidase
IDO	Indolamina-2,3-dioxigenase
i.p	Via de administração intraperitoneal
ISRSs	Inibidores seletivos de recaptção de serotonina
Kg	Quilograma
MAO	Monoaminoxidase
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
Min	Minutos
mg	Miligrama
mL	Mililitros
NA	Noradrenalina
NO	Óxido Nítrico
v.o	Via de administração oral
°C	Graus Celsius
%	Por cento (percentagem)
5-HT	Serotonina
50-2A	2-alilfenol na dose de 50 mg/kg
75-2A	2-alilfenol na dose de 75 mg/kg
100-2A	2-alilfenol na dose de 100 mg/kg

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	12
2.	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	15
	2.1 Depressão maior.....	15
	2.2 Fisiopatologia da depressão.....	18
	2.2.1 Teoria das monoaminas	18
	2.2.2 Estresse e o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA).....	20
	2.2.3 A depressão e a inflamação	22
	2.3 Tratamento.....	24
	2.4 Fenilpropanoides e 2-alilfenol.....	28
	2.5 Modelos animais	29
	2.6 Justificativa.....	31
3.	OBJETIVOS.....	33
4.	METODOLOGIA	34
	4.1 Animais.....	34
	4.2 Drogas.....	34
	4.3 Métodos.....	35
	4.3.1 Procedimento Experimental.....	35
	4.3.2 Triagem farmacológica comportamental.....	38
	4.3.3 Avaliação da evolução ponderal	38
	4.3.4 Teste de suspensão de cauda.....	38
	4.3.5 Teste de borrifagem de sacarose (splash).....	38
	4.3.6 Teste do campo aberto	39
	4.3.7 Gravação e análise dos vídeos.....	39
	4.3.8 Análise estatística	39
5.	RESULTADOS.....	41

Triagem farmacológica	41
Avaliação da evolução ponderal.....	42
Teste de suspensão de cauda	42
Teste de borrifagem de sacarose (splash test)	44
Teste do campo aberto	45
6. DISCUSSÃO.....	48
7. CONCLUSÃO	53
8. REFERÊNCIAS	54
ANEXO.....	63
Anexo A – Certidão de aprovação do projeto junto à Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA).	63
Anexo B –Formulário para Triagem Farmacológica Comportamental.....	64
Glossário	66

1. INTRODUÇÃO

O transtorno depressivo se trata de uma condição de estado onde há pouco ânimo para as atividades corriqueiras. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), em 2017, cerca de 300 milhões de pessoas ao redor do mundo são acometidos por esse transtorno, sendo a prevalência maior em mulheres (OSANLOO et al., 2016) e, tornando-se, a segunda condição patológica com maior prevalência global (HIDAKA, 2012).

A primeira vez que ocorreu a descrição dessa doença foi no século V antes de Cristo, por Hipócrates, que definia como melancolia o comportamento de medo ou tristeza que durava por longos tempos, descrevendo em seus manuscritos mais detalhadamente a doença que séculos depois seria conhecida como depressão (HORWITZ et al., 2017).

Apesar de não se ter um comportamento depressivo totalmente padronizado, há sintomas comportamentais que apresentam maior expressão no meio dessa população e, esses são: choro, isolamento social, irritabilidade, diminuição da libido, fadiga, exacerbação de dores pré-existentes e dores secundárias ao aumento da tensão (GARCIA et al., 2016). Outros comportamentos comuns são atividade diminuída, mesmo tendo a agitação como uma característica, fome e sono reduzido (BENTLEY et al., 2014). Esses dois últimos pontos, em alguns casos clínicos, podem se apresentar de forma oposta, gerando um ganho de massa e sonolência (DHINGRA, BANSAL, 2014; GOLD et al., 2015). Também é possível identificar alterações cognitivas, tais como: baixa concentração e atenção reduzida, pensamentos negativos e pessimistas, desaceleração mental e ruminação, nome que caracteriza um padrão de pensamento persistente (CASSANO, FAVA, 2002).

A depressão maior é considerada um transtorno multifatorial, sendo interação de vários fatores onde podemos citar os genéticos e epigenéticos, ambientais, resposta inflamatória, problemas na regulação hormonal (SULLIVAN, NEALE, KENDLER, 2000; DELITALA et al., 2016; NEMEROFF, 1996).

Dentre todas as teorias para etiologia da depressão, a mais bem aceita é a das monoaminas. Ela justifica que o surgimento do comportamento do tipo depressivo é devido ao decréscimo na concentração dos neurotransmissores monoaminérgicos presentes nas fendas sinápticas em certas regiões do sistema nervoso central

(SNC), principalmente a noradrenalina (NA) e serotonina (5-HT) (WILLNER et al., 2013; YOHN et al., 2017).

Por tal razão as três classes de fármacos mais conhecidas no combate dessa condição agem tentando regularizar a neurotransmissão das monoaminas, essas classes são: inibidores seletivos de recaptção de serotonina (ISRSs), inibidores da MAO (monoaminoxidase) e drogas tricíclicas (MANNAN et al., 2015). Entretanto, pesquisas mostram que cerca de 13% dos pacientes, apresentam uma baixa resposta após cinco anos fazendo consumo dos medicamentos (ZHOU et al., 2017; ANDREWA, NEMEROFF, 1994; KELLER et al., 1992). Nesse cenário, procura-se drogas de origem natural que demonstrem menos efeitos colaterais do que os medicamentos atuais (MANNAN, ABIR, RAHMAN, 2015).

Outra teoria discutida para etiologia da depressão é o caso do estresse prolongado levar a um quadro sintomatológico de depressão. Quando um indivíduo passa por situações de estresse, esse podendo ser físico ou psicológico, a glândula adrenal libera cortisol por meio da sinalização de corticotropina comandada pela hipófise, que é estimulada pelo fator liberador de corticotropina (CRF) (GRAGNOLI, C, 2012; IWATA et al., 2013). O glicocorticoide, por sua vez, age por *feedback* negativo na produção de CRF.

Já foi identificado que alguns pacientes depressivos continuam o nível de CRF aumentado no fluido cerebrospinal, indicando assim uma relação intrínseca desse hormônio com a depressão maior, por gerar alterações comportamentais semelhantes a esse transtorno, tais como diminuição no apetite, perda da libido e alterações psicomotoras (NEMEROFF et al., 1984). Além disso, foi demonstrado que compostos antagonistas ao receptor CRH1, presentes no sistema nervoso central, mostraram efeitos antidepressivos (HOLSBOER, ISING, 2008) e que a maioria de pacientes com depressão maior apresentam um alto nível de cortisol em sua saliva, plasma e urina (NEMEROFF, VALLE, 2005). Assim, avalia-se uma desregulação no *feedback* negativo da produção do cortisol.

Considerando o fato desta doença estar cada vez mais presente na nossa sociedade e o tratamento convencional não ser capaz de suprir a necessidade de todos os pacientes acometidos pela doença, faz-se necessário a busca por novos fármacos que apresentem poucos efeitos adversos e tenha excelente efetividade. Para tal, estudos com animais são uma oportunidade de entender melhor esta

condição e buscar novas drogas a partir de protocolos que venham a gerar um comportamento do tipo depressivo.

Um dos protocolos mais utilizados para estudo do comportamento do tipo depressivo é o de estresse crônico imprevisível. Criado em 1997, esse protocolo já foi modificado ao longo dos anos para se tornar apto a ser executado em diversos laboratórios, tentando ao máximo que se adeque a realidade do mesmo. O período deste protocolo consiste de 5-8 semanas (ISHIKAWA et al., 2017; MARIN et al., 2017), tempo inviável para ser realizado em muitos laboratórios. Protocolos com 14 dias já se provaram eficientes quando aplicados em fêmeas (CARNEIRO, 2017; NEIS et al., 2016), assim sendo necessária comprovar sua eficácia quando aplicado à machos.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Depressão maior

O transtorno depressivo maior é uma condição onde o indivíduo acometido apresenta, geralmente, as seguintes características: humor deprimido, fadiga, hiperfagia ou falta de apetite, insônia ou sonolência constante, entre outros (WHITTIER et al., 2016; CHANNON, BAKER, ROBERTSON, 1993; GERBER et al., 1992; BENTLEY et al., 2014). Estudos mostram uma relação entre depressão e diversas áreas da vida daqueles que a detêm; sendo comum pessoas depressivas terem maior dificuldade no aprendizado, em manter relações sociais por tempo prolongado e sucesso financeiro quando comparados a população sadia (KESSLER, 2012). Entretanto o vínculo causa e consequência ainda não foi estabelecido.

De maneira geral, a caracterização de um transtorno comportamental é complexa. Isso se deve ao fato da sintomatologia entre diversas patologias serem semelhantes entre si ou por falha no diagnóstico (FARRELL, GANZINI, 1995; GROSSMAN, 2004). Por tal motivo, faz-se necessário uma análise clínica eficiente para a classificação adequada do transtorno.

Entretanto, até os dias atuais não há nenhum componente bioquímico que possa ser, por definitivo, avaliado para um diagnóstico preciso da depressão. Nesse contexto, existem diretrizes apontadas no Manual de Diagnóstico e Estatístico de Doenças Mentais (DSM-5) ou o Código Internacional de Doenças (CID-10) para guiar um especialista na identificação e classificação do tipo de depressão. Na Figura 1, observa-se os diferentes tipos de depressão de acordo com cada uma das diretrizes.

A

CID 10

Episódio depressivo

- Leve
- Moderado
- Grave
- Com sintomas psicóticos
- Sem sintomas psicóticos

Outros episódios depressivos

Episódio depressivo não especificado

Transtorno depressivo recorrente, episódio atual

- Leve
- Moderado
- Grave
- Com sintomas psicóticos
- Sem sintomas psicóticos

Transtorno depressivo recorrente, atualmente em remissão

Outros transtornos depressivos recorrentes

Transtorno depressivo recorrente sem especificação

B

DSM-5

Transtorno disruptivo da desregulação de humor

Transtorno depressivo maior

Transtorno depressivo persistente (distímia)

Transtorno disfórico pré-menstrual

Transtorno depressivo induzido por substância/medicamento

Transtorno depressivo devido outra condição médica

Outro transtorno depressivo especificado

Transtorno depressivo não especificado

Figura 1 - Classificação da depressão pelo CID-10 (A) e DSM-V (B)

Oliveira e Fumis (2018) mostraram que a prevalência de depressão e ansiedade em pacientes hospitalizados se mostra significativamente maior nas mulheres do que os homens. Outros trabalhos também demonstram esse mesmo perfil de diferenças de sexo, como demonstrado na Tabela 1. Além do parâmetro de gênero, a idade se mostra um fator importante, sendo maior entre 60-64 anos, segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS).

Tabela 1 - Comparação entre a prevalência para o transtorno depressivo maior em homens e mulheres.

Prevalência comparativa	Fonte
Canadá Mulheres: 5,8% Homens: 3,6%	ALBERT, 2015
Filadélfia Mulheres: 8% Homens: 4%	LEHTINEN, JOUKAMAA, 1994
Rio Grande do Sul Mulheres: 21,4% dos casos, Homens: 12,3% dos casos	BRETANHA et al., 2015
Pernambuco Mulheres: 32 casos de 154 Homens: 13 casos de 80	VASCONCELOS et al., 2014
Brasil Mulheres: 10,9% Homens: 3,9%	STOPA et al., 2015
Minas Gerais Mulheres: 29,1% Homens: 24,8:	RAMOS et al., 2015

Uma possível causa para tal prevalência seria a resposta fisiológica ao estresse, em parte, específica de gênero: as mulheres geralmente apresentam maior responsividade ao estresse do que os homens (HASLER, 2010).

Segundo documento da Organização Mundial da Saúde, a idade se mostra um fator importante, sendo a prevalência da depressão maior entre 60-64 anos. E este

mesmo documento demonstra o predomínio desse transtorno em diversas regiões do mundo, Figura 2.

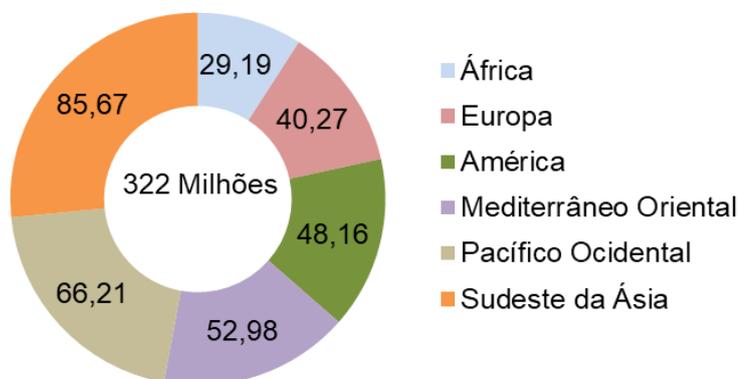


Figura 2 - Números de casos de depressão maior por região. Fonte: Organização Mundial da Saúde (OMS), 2017.

2.2 Fisiopatologia da depressão

Devido a natureza multifatorial do transtorno depressivo, faz-se necessário compreender alguns dos mecanismos que já estão na literatura vinculados com essa condição. O entendimento da associação desses fatores para surgimento da depressão se mostra extremamente complexo. Por tal razão, abaixo será explicado mais detalhadamente, alguns dos possíveis fatores.

2.2.1 Teoria das monoaminas

Essa teoria surgiu na década de 1960 por Schildkraut, ao perceber que os fármacos antidepressivos aumentavam os níveis de monoaminas, em especial noradrenalina (NA) e serotonina (5-HT), assim concluindo que a depleção desses neurotransmissores seria uma possível causa para o transtorno depressivo. Posteriormente foi demonstrado que a diminuição dos níveis de dopamina também estaria influenciando para presença do transtorno. Outros estudos demonstram que neurônios noradrenérgicos, serotoninérgicos e dopaminérgicos se apresentam em alta densidade em regiões envolvidas com o comportamento, tais como hipocampo, amígdala, mesencéfalo e outras (ZHOU et al., 2017; YOHN et al., 2017).

Há neurônios serotoninérgicos que apresentam projeção para o proencéfalo, sendo essa regulação de serotonina importante para modulação do humor, da cognição e controle da função endócrina (RICHELSON, 2001). A noradrenalina e sua rede neuronal modula a vigiância, a resposta ao estresse, o controle da dor e atividade do sistema nervoso simpático. A dopamina (DA), além de servir como precursor pra outros neurotransmissores, a exemplo da adrenalina e noradrenalina, também está correlacionada com distúrbios do SNC, citando-se a doença de Parkson e esquizofrenia (GOLAN, 2009).

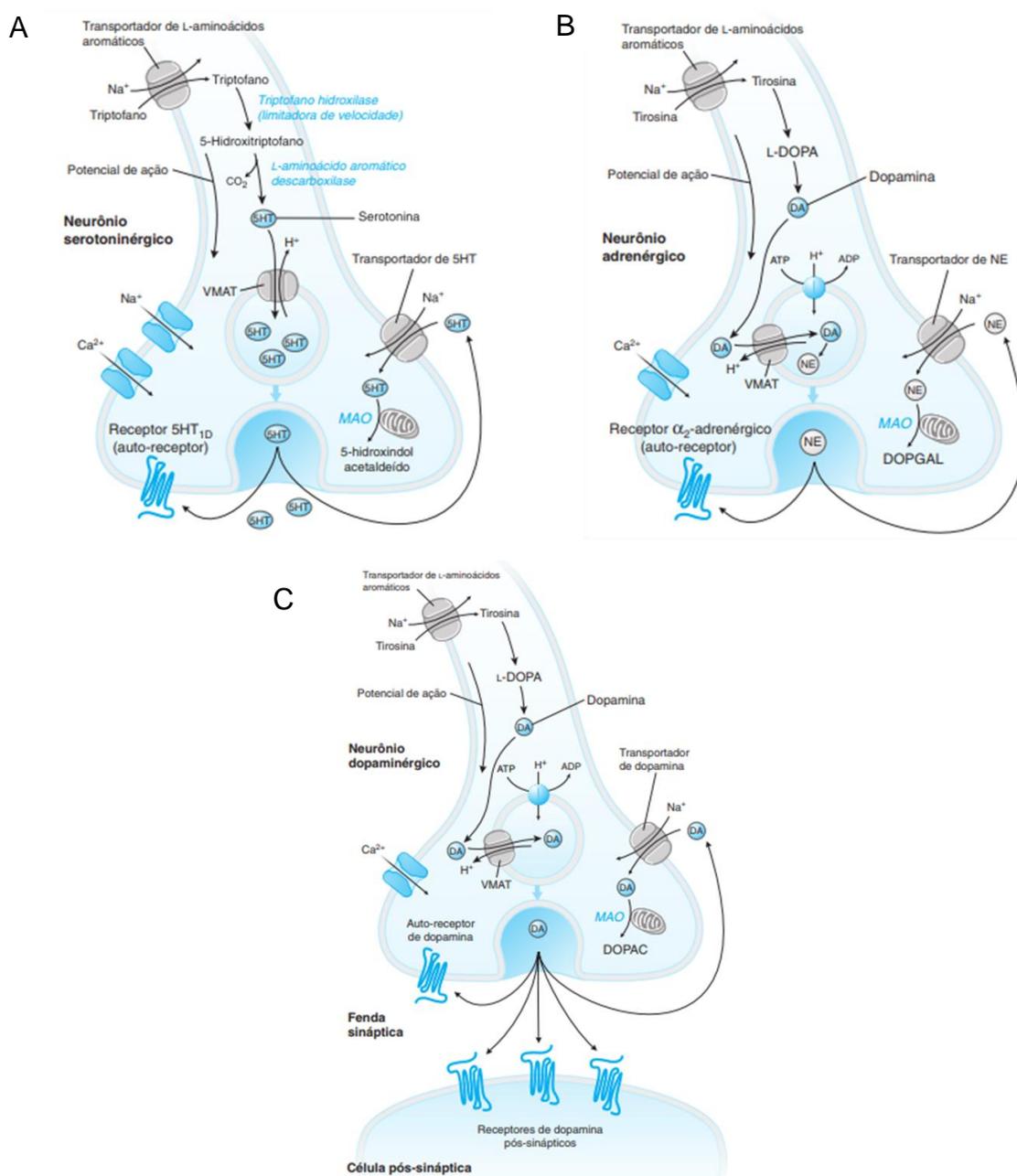


Figura 3 - Regulação pré-sináptica de neurônios serotoninérgicos (A), noradrenérgicos (B) e dopaminérgicos (C). Fonte: GOLAN, 2009

Quando o neurônio é estimulado, as vesículas armazenadoras dessas aminas biogênicas se fundem, de modo dependente de Ca^{2+} , à membrana plasmática e assim liberando o neurotransmissor na fenda sináptica que pode se ligar ao seu receptor no neurônio pós-sináptico, serem recapturadas por proteínas de membrana do neurônio pré-sináptico ou até mesmo degradada por enzimas no meio extracelular (GOLAN, 2009).

A MAO é uma enzima-chave cuja função consiste em interromper a ação das catecolaminas tanto no cérebro quanto na periferia, por sua desativação. Paralelamente quando a DA e NA sináptica que não é captada na célula pré-sináptica nem se liga ao receptor do neurônio pós-sináptico pode se difundir para fora da fenda sináptica ou ser degradada pela ação da COMT, enzima expressa pelos neurônios que inativa as catecolaminas (STANDAERT, GALANTER, 2009).

Atualmente a teoria das monoaminas é considerada reducionista por não conseguir justificar por si a razão que os fármacos antidepressivos apresentam em uma grande percentagem dos pacientes (40%) uma latência para iniciar seus efeitos (PEREIRA, 2011). Assim sendo, outros modelos estão sendo pesquisados para tentar entender melhor essa doença, sendo um desses modelos o de estresse que, em diversos estudos, vem se mostrando efetivo na instauração do comportamento do tipo depressivo.

2.2.2 Estresse e o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA)

O estresse foi definido em 1956 como uma resposta geral e inespecífica do organismo a um estressor ou a uma situação estressante, sendo fisiológico em níveis baixos (SELYE, 1973). A situação de estresse pode ser dividida em três componentes principais: o estressor (aquele que gera o estresse e perturba a homeostase); estresse (o que o cérebro entende quando há o estressor); resposta ao estresse. Essa resposta ao estresse está relacionada aos aspectos cognitivos, comportamentais e fisiológicos para enfrentar o estressor (MARGIS et al., 2003).

Vale salientar que quando um organismo é posto em situação de estresse, ele tende a criar respostas adaptativas (alostase). Entretanto, caso esse estímulo seja de grande intensidade ou de forma prolongada, pode gerar déficits ao organismo, como por exemplo: danos ao sistema cardiovascular, gastrointestinal, imunológico, ao SNC e até, em casos mais graves, levando a morte (SIBA, 2013; JUSTER et al.,

2010). Pessoas que passaram por vários eventos traumáticos na vida, tendem a apresentar maior tendência a desenvolverem depressão (AGID, KOHN, LERER, 2000).

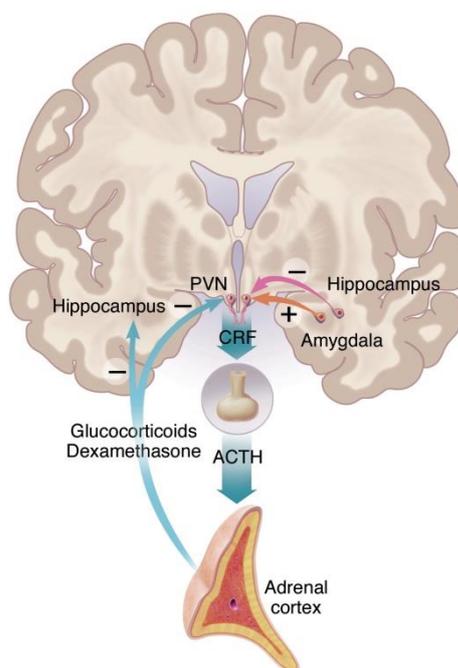


Figura 4 - Regulação do Eixo HPA. Em situações de estresse, a produção exacerbada do cortisol leva à desregulação do *feedback negativo*, mantendo essa alta concentração desse glicocorticoide e gerando alterações fisiológicas que levam a um comportamento do tipo depressivo. Hormônio adrenocorticotrófico (ACTH); núcleo paraventricular (PVN); fator liberador de corticotropina (CRF). Fonte: Nestler et al, 2002.

Um mecanismo pelo qual o cérebro responde ao estímulo estressor agudo ou crônico é através do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA ou, mais conhecido, HPA). Existe uma região no hipotálamo chamado de núcleo paraventricular (PVN), cujos neurônios têm projeção para hipófise anterior ou adenohipófise e lá secretam o fator/hormônio de liberação de corticotropina (CRF/CRH), promovendo a síntese e liberação da adrenocorticotropina (ACTH) que estimula a síntese e liberação pela zona fasciculada da adrenal de glicocorticoides (PARIANTE, LIGHTMAN, 2008). Por sua vez, o glicocorticoide (cortisol em humanos), age em regiões do SNC, incluindo o hipocampo e a amígdala, que exercem uma influência inibitória (*feedback negativo*) e excitatória (*feedback positivo*), respectivamente, sobre a atividade do hipotálamo. (NESTLER et al., 2002).

É citado na literatura que uma grande porcentagem de pacientes acometidos pelo transtorno depressivo maior apresentam altos níveis séricos de cortisol, bem como animais de laboratório também apresentam corticosterona elevada (FRODL, O'KEANE, 2013; SAVEANU, NEMEROFF, 2012). Acredita-se que a hipercortisolemia, gerada pela aplicação de estressores, aumente a predisposição ao desenvolvimento do transtorno depressivo, devido às alterações plásticas e estruturais em várias regiões do sistema nervoso central, incluindo o hipocampo, o córtex pré-frontal e as estruturas límbicas (PEREIRA, 2011).

Tendo isso em vista, algumas pesquisas indicam que ocorre uma dessensibilização dos receptores para glicocorticoides, o que acarretaria em um prejuízo na via de regulação de *feedback* negativo, hipertrofia da hipófise bem como da adrenal, também acarretando em uma redução do volume do hipocampo, por ocorrer redução dos dendritos dos neurônios da região CA3 e do giro denteado (RIBONI, BELZUNG, 2017; CLOW et al., 2010; SIBA, 2013).

2.2.3 A depressão e a inflamação

Além das alterações no eixo HPA, vários estudos vêm trazendo que pacientes com o transtorno depressivo maior apresentam aumento sérico de citocinas pró-inflamatórias, exemplo de IL-6 e TNF α (RAWDIN et al., 2012). Essa relação se iniciou ao notar que pacientes com inflamações apresentavam o *sickness behavior* (comportamento de doença) que continha elementos em comum com a sintomatologia do transtorno depressivo maior, como: anedonia, fadiga e alterações do peso (HASLER, 2010).

De maneira complementar, estudos demonstram que o uso de medicamentos antiinflamatórios, além de se mostrarem efetivos na recuperação do comportamento de doença, também demonstrou melhora no quadro de pessoas diagnosticadas com o transtorno depressivo maior e foram efetivos em restaurar os níveis das monoaminas bioativas nesses pacientes (EYRE et al., 2015; ABBASI et al., 2012). Com tais dados, vê-se que o link entre inflamação e depressão maior vai além do comportamental, mas também envolvem mecanismos fisiológicos como a frente demonstrados.

As citocinas pró-inflamatórias tem ação sobre o hipotálamo, promovendo a liberação de CRF e, conseqüentemente, cortisol, ao mesmo tempo que auxilia na

resistência ao cortisol no *feedback negativo*. Fisiologicamente, esse glicocorticoide inibe a liberação dessas citocinas pró-inflamatórias, entretanto, quando a pessoa está submetida a uma situação de estresse, físico ou psicológicos, os níveis séricos e no cérebro aumentam (ITAWA et al., 2013).

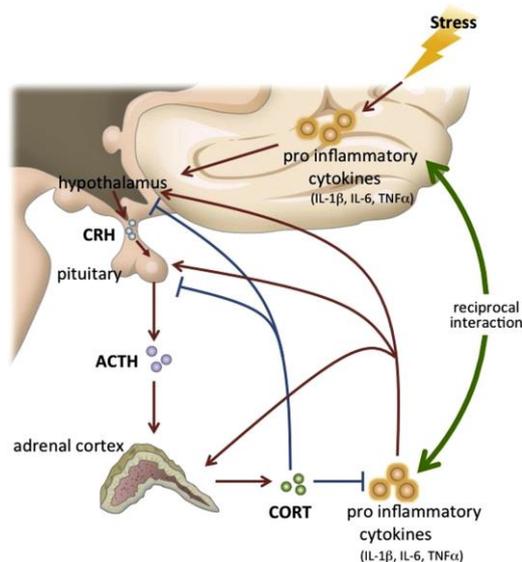


Figura 5 - Relação entre atividade das citocinas pró-inflamatórias e eixo HPA. Cortisol (CORT); hormônio liberador de corticotropina (CRH). Fonte: ITAWA et al. 2013.

As citocinas pró-inflamatórias agem no sistema nervoso por diferentes vias e quando a inflamação se dá de forma crônica, ocorrem diversos malefícios. Essas citocinas ativam a enzima indoleamina-2,3-dioxigenase (IDO) que é responsável pela degradação do triptofano e promovendo uma depleção na produção de serotonina. Os metabólitos gerados pela ação da IDO são, em sua maioria, neurotóxicos. Também aumentando a atividade da MAP quinase (MAPK) que vai promover a recaptção de serotonina por meio das proteínas de membrana, fazendo com que a concentração biodisponível desse neurotransmissor seja ainda menor (VALKANNOVA, EBMEIER, ALLAN, 2013).

As citocinas também agem causando depleção nos níveis de dopamina. O principal mecanismo é através da produção de óxido nítrico (NO) pela micróglia, fazendo uso do tetrahydrobiopterina (BH4), um importante cofator da enzima tirosina-hidroxilase, que está presente na produção da dopamina (MILLER, MALETIC, RAISON, 2009). Ou seja, sem o cofator da enzima, que está sendo usado para produção de NO, há uma redução da amina disponível. Além disso, a MAPK também está ativada, promovendo a recaptção de DA (BRAGA, CAMPAR, 2014).

Outro estudo exibiu que o tratamento com amitriptilina, um antidepressivo tricíclico, demonstrou bons resultados na redução dos níveis séricos de IL-1 β , entretanto não mostrando resposta no controle dos níveis de TNF α (ALCOCER-GÓMEZ et al., 2014). Isso sugere que tal citocina tem um papel importante na resposta ao tratamento do transtorno depressivo maior.

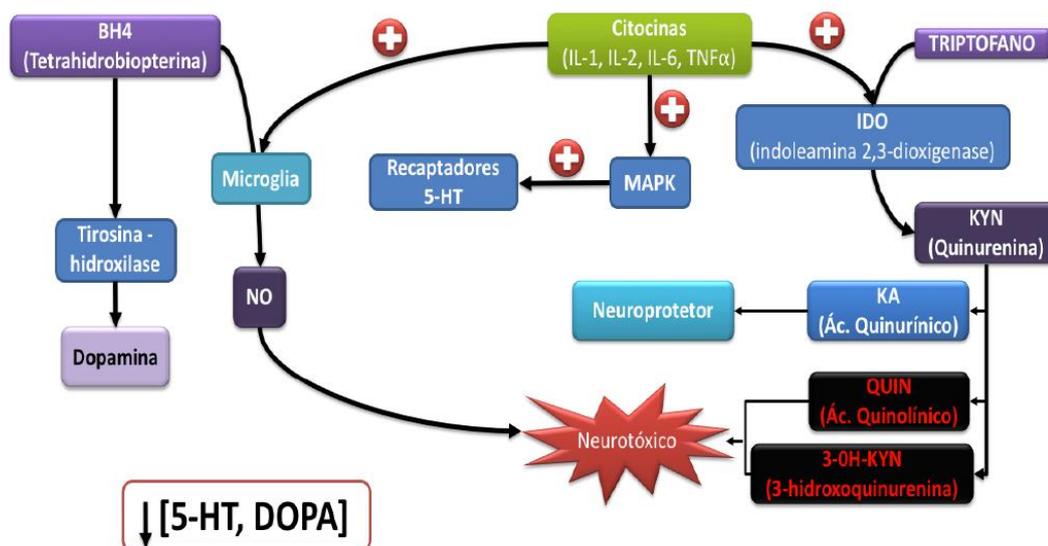


Figura 6 - Atividade das citocinas pró-inflamatórias no Sistema Nervoso Central. Fonte: CARNEIRO, 2017.

2.3 Tratamento

Atualmente existem várias classes de fármacos que podem ser utilizadas para o tratamento do transtorno depressivo maior, podendo citar: inibidores seletivos de recaptção de serotonina (ISRSs), inibidores da MAO (monoaminoxidase), drogas tricíclicas, drogas tetracíclicas, inibidores da recaptção de dopamina e noradrenalina, inibidores da recaptção da serotonina e noradrenalina e modulador de serotonina (TelesaúdeRS-UFRGS, 2017). Na Figura 7 é possível ver a via de ação das três classes farmacêuticas mais conhecidas para que tenham seu efeito farmacológico desejado.

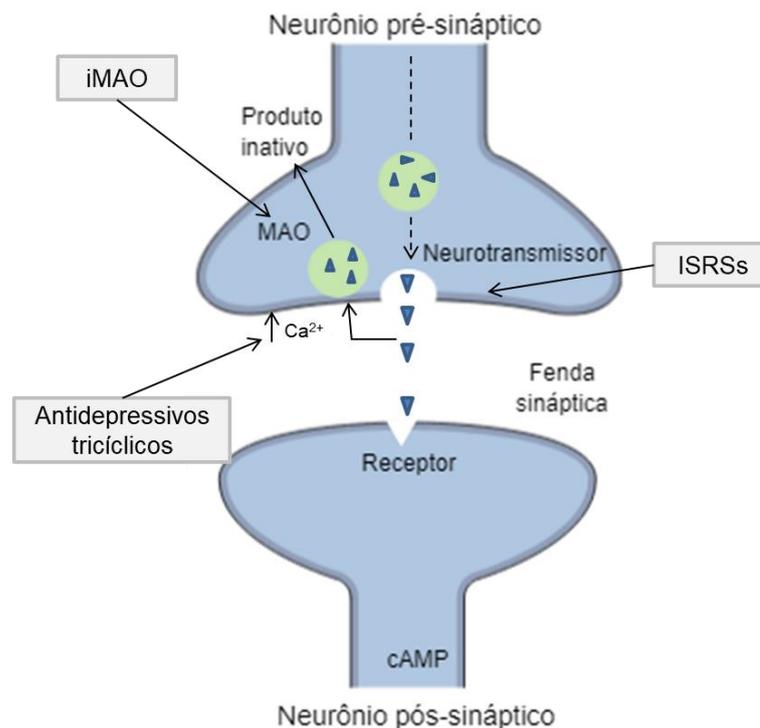


Figura 7 - Atuação de três classes farmacológicas de antidepressivos. Inibidores da monoaminooxidase (iMAO); inibidores seletivos de serotonina (ISRSs). Fonte: própria

Os inibidores da monoaminooxidase (iMAO) são fármacos que agem na enzima MAO, que é intracelular e está ligada ao lado citosólico das membranas externas das mitocôndrias, existindo as isoformas MAO-A e MAO-B (BINDA et al., 2002).

Vários efeitos colaterais são correlacionados com o consumo de iMAO, podendo variar de acordo com a especificidade para o isômero da MAO. Entretanto, em linhas gerais, os mais comuns são: hipotensão ortostática, tontura, insônia e náusea (BARTHOLOMEW, 1962; FIEDOROWICZ, SWATZ, 2004). Entretanto também são vistos efeitos colaterais tardios, que surgem após o consumo por tempo prolongado do fármaco e são caracterizados por ganho de peso, edemas, dores musculares e disfunção sexual, dentre outros (EVANS, DAVIDSON, RAFT, 1982; FAVA, 2000).

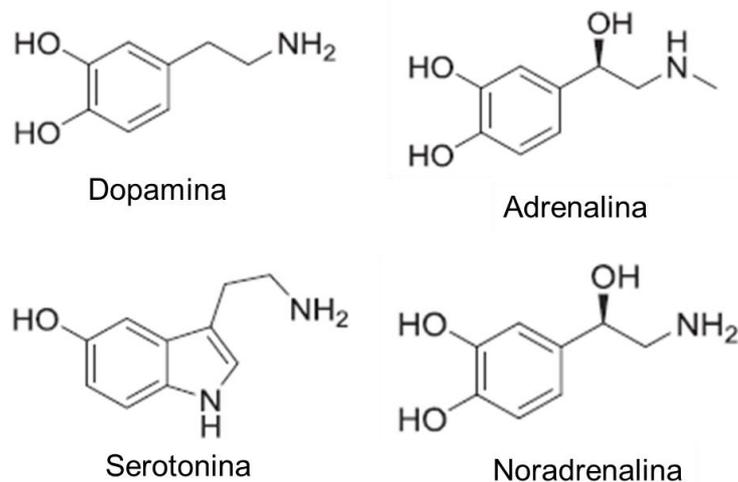


Figura 8 - Substratos para atuação da monoaminoxidase. Fonte: Binda et al., 2002.

Os antidepressivos tricíclicos são responsáveis por uma gama de efeitos bioquímicos, sendo assim difícil compreender todos os mecanismos que podem fazer essa classe gerar o efeito antidepressivo. Entretanto é comum a todos os antidepressivos tricíclicos, potencializar a disponibilidade das aminas biogênicas (5-HT e DA) dentro do SNC, agindo ou por bloquear a inativação dessas aminas ou por inibir sua recaptação (BROWN, BOTTOMLEY, 1990). A intensidade e seletividade para tal efeito pode variar a depender de qual droga pertencente a esta classe esta sendo administrada.

Por sua baixa especificidade quando comparado à outras classes, os antidepressivos tricíclicos demonstram uma leque amplo de efeitos adversos, sendo os mais graves relacionados ao sistema cardiovascular, por gerar atrasos potencialmente letais da condução do impulso elétrico, a exemplo do bloqueio atrioventricular de primeiro grau (GOLAN, 2009) . Por tal motivo, deve-se averiguar a possibilidade de doenças cardiovasculares antes de indicar essa classe farmacológica. Devido à falta de especificidade, os antidepressivos tricíclicos podem agir como antagonistas em certos receptores:

- Adrenérgicos: podendo gerar efeitos adversos de hipotensão ortostática, taquicardia reflexa, sonolência e tonteira;
- Histamínicos: podem ocasionar sedação e ganho de peso do paciente, e em caso de idosos, ainda ocorre o risco de promover confusão;
- Muscarínicos: a inibição colinérgica via receptores muscarínicos geram os efeitos colaterais mais característicos dessa classe farmacológica,

sendo esses náusea, vômitos, anorexia, boca seca, visão turva, confusão, constipação, taquicardia e retenção urinária.

A atividade dos inibidores seletivos de recaptção de serotonina (ISRSs) agem bloqueando a atividade das proteínas pré-sinápticas que atuam recaptando a serotonina disponível, agindo com alta seletividade e permitindo um aumento desse neurotransmissor na fenda sináptica (TAYLOR et al., 2005).

Devido a sua maior especificidade, os ISRSs dificilmente se ligam aos receptores muscarínicos ou adrenérgicos e, por consequência, apresentam menos efeitos colaterais do que os antidepressivos tricíclicos (MORENO, MORENO, SOARES, 1999). Entretanto ainda assim, como qualquer fármaco, os ISRSs apresentam efeitos colaterais que podem ser:

- Gastrintestinal: náuseas, vômitos, dor abdominal e diarreia;
- Reações dermatológicas: aparecimento de urticária, podendo ou não estar acompanhada por febre, artralgia e eosinofilia;
- Efeito psiquiátrico: em concentração mais alta, a maior parte dos ISRS apresentam agitação, ansiedade, insônia, ciclagem para mania e nervosismo por quem passa pelo tratamento;
- Alteração do peso: a variação ponderal dos pacientes altera (engordam ou emagrecem);
- Disfunção sexual: o uso de ISRS leva a um quadro de retardo ejaculatório em homens e anorgasmia em mulheres.

Outro efeito colateral muito marcante da classe dos inibidores seletivos de recaptção de serotonina é a síndrome serotoninérgica, que é quando a concentração de 5-HT se encontra muito elevada, chegando a níveis de toxicidade ou pela ingestão de uma dose elevada de ISRS ou pela combinação dessa classe com um fármaco da classe iMAO (VOLPI-ABADIE, KAYE, KAYE, 2013). Essa síndrome é caracterizada por uma sintomatologia ampla: hipertensão leve e taquicardia, midríase, tremores, ruídos intestinais hiperativos, agitação leve, hipervigilância e fala pressionada.



Figura 9 - Etapas identificadas no tratamento contra a depressão maior. Fonte: adaptado de Fleck et al., 2009.

Durante o tratamento, com o uso contínuo de todas as classes farmacológicas, é observado um perfil dividido em fases que dependem do tempo, sendo essas: aguda, de continuação e de manutenção (FLECK, BAEZA, 2013). Em todos os momentos, o paciente é passível de se ter momentos de recaída, segundo observado na Figura 9.

Conhecendo a intensidade do transtorno da pessoa, as possíveis interações farmacológicas e as singularidades do indivíduo, pode-se propor uma posologia para o tratamento. Vale salientar que os fármacos pertencentes as classes explanadas nesse trabalho usualmente apresentam os efeitos após duas semanas de uso constante (KELLAR, STOCKMEIER, 1986; WAGNER et al., 2017).

Novas linhas de pesquisa trazem a ideia de encontrar novos fármacos antidepressivos através da procura em fontes naturais (MANNAN, ABIR, RAHMAN, 2015; O'LEARY, DINAN, CRYAN, 2015). Essa escolha se deve à pesquisa de novas substâncias que promovam menos efeitos colaterais (OSANLOO et al., 2016).

2.4 Fenilpropanoides e 2-alilfenol

Os fenilpropanoides são compostos químicos presentes em pequenas quantidades nos óleos essenciais de plantas, sendo um indicador para possíveis estresses ao qual a planta esteja submetida (LA CAMERA et al., 2004). Eles são formados a partir do ácido chiquímico e alguns deles são os bioativos no combate a

certas doenças, como exemplo contra asma, diabetes e atividade antinociceptiva (LEE et al., 2011; KRISHNAN, SUBRAMANIAN, PILLAI, 2014; FERLAND, BEAUDRY, VACHON, 2012).

O 2-alilfenol (Figura 10) é um fenilpropanoide amplamente utilizado na China com o nome de Yinguo e possui semelhança com outros compostos, a exemplo do ginkgol (Xia et al., 2010). Na literatura, sua atividade antifúngica já é bem conhecida contra as espécies *Pythium aphanidermatum*, *Rhizoctonia cerealis*, *Botritis cinérea*, *Valsa mali*, dentre outros (QU et al., 2017; GONG et al., 2009).

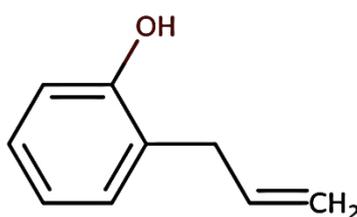


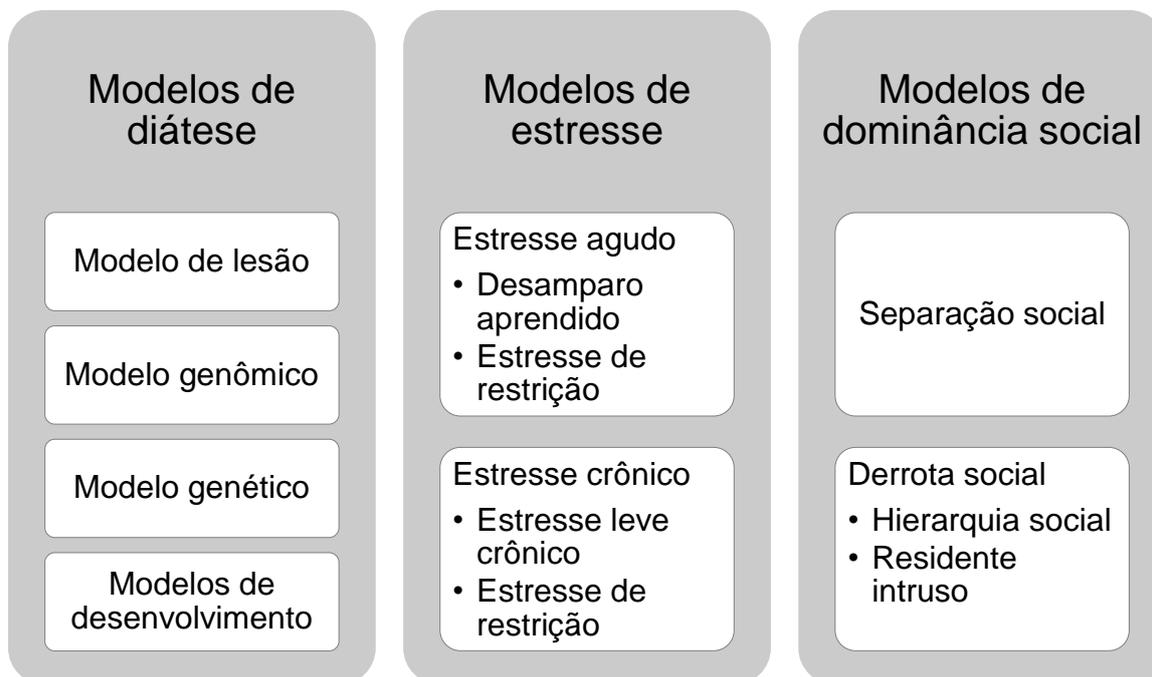
Figura 10- Estrutura bidimensional do fenilpropanoide 2-alilfenol. Fonte: PubMed

Entretanto são escassos os estudos em animais, a fim de averiguar sua atividade no SNC. Em um desses estudos, verificou-se que esse fenilpropanoide apresentava atividade antinociceptiva através de participação nos sistemas adenosinérgicos e glutamatérgicos (ASSIS, 2016).

2.5 Modelos animais

Estudos mostram possíveis formas de desenvolver o comportamento do tipo depressivo em animais e assim conseguir encontrar drogas com atividade farmacológica contra depressão com segurança e confiabilidade (FUCHS, FLÜGGE, 2006). Para tal, alguns modelos já são estabelecidos na literatura, como demonstrado na Tabela 3.

Tabela 2 - Modelos animais para implementação do comportamento do tipo depressivo. Fonte: Fuchs, Flügge, 2006.



Em linhas gerais, os modelos de diátese dependem que haja uma predisposição genética para desenvolvido do comportamento depressivo enquanto que os outros dois modelos, o de estresse e dominância social, depende de estímulos externos para se obter o mesmo resultado.

Para a escolha do modelo experimental comportamental, deve-se considerar dois fatores distintos: a fidedignidade e validade (ALMEIDA, 2006). A fidedignidade se refere a consistência e estabilidade de um modelo, gerando o resultado final igual caso refeito. Já a validade se refere à certificação que certa metodologia é eficiente em gerar o efeito desejado. Essa última característica se divide em alguns aspectos descritos na Tabela 4.

Tabela 3 - Diferentes medidas de validade. Fonte: adaptado de SOUZA, ALEXANDRE, GUIARDELLO, 2017.

Tipo de validade	Definição
Validade de conteúdo	É o grau em que um teste inclui todos os itens necessários para representar o conceito a ser medido.
Validade de critério	É avaliada quando um resultado pode ser comparado a um “padrão-ouro”.
Validade concorrente	Pode ser verificada aplicando-se ambos, o teste-alvo e o “padrão ouro”, ao mesmo tempo.

Validade preditiva	Primeiro o teste-alvo é aplicado e posteriormente o “padrão-ouro”
Validade de construto	É a extensão em que um conjunto de variáveis representa, de fato, o construto que foi projetado para medir.
Validade discriminante	Testa a hipótese de que a medida alvo não está relacionada indevidamente, com construtos diferentes, ou seja, com variáveis das quais deveria divergir.
Validade estrutural	Testa se uma medida capta a dimensionalidade hipotética de um construto.

Considerando esses aspectos, um dos protocolos já estabelecido escolhido foi o de estresse crônico imprevisível. Esse método foi primeiramente descrito no início da década de 1980 por Katz (KATZ, HERSCH, 1981; WILLNER, 2017) e, com o tempo, foi modificado para incluir apenas estressores leves (estresse leve crônico), mantendo o resultado do teste não clínico de anedonia, mudanças no peso, insônia ou hipersonia, perda de apreço por consumo de açúcar, humor deprimido e alterações nos níveis de monoaminas (COX et al., 2011; KATZ et al., 1982).

Entretanto esse protocolo exige uma demanda laboratorial intensa pelo tempo de protocolo, que pode durar de um a dois meses, na maioria dos casos, e pela manutenção dos animais, sendo criterioso para evitar variações na metodologia que possam alterar o resultado de gerar o comportamento do tipo depressivo. Nesse contexto alguns trabalhos empenham em encontrar forma de aplicar estressores em tempo reduzido, gerando as mudanças fisiológicas e comportamentais (NEIS et al., 2016) . No estudo de Carneiro (2017), foi validado um protocolo de 14 dias de estresse com camundongos (*Mus musculus*) Swiss fêmeas. Considerando a diferença na prevalência vista entre gêneros, sendo maior entre as fêmeas, necessita-se a verificação em machos.

2.6 Justificativa

Na literatura substâncias oriundas de plantas já são testadas quanto a atividade antidepressiva (OSANLOO et al. 2016). Pesquisas que utilizam o extrato metanólico de *Bacopa monniera* para averiguar sua atividade antidepressiva (MANNAN, ABIR, RAHMAN, 2015).

Vendo pesquisas com compostos isolados, há trabalho que averigua uma substância que apresenta similaridade estrutural com o 2-alilfenol, o timol, monoterpene bioativo isolado de *Thymus vulgaris*, *Monarda punctata* e *Origanum vulgare* spp. (COSTA, LODESANI, MAISTRELLO, 2010). Já foi visto que o timol apresenta atividade antidepressiva em camundongos machos submetidos ao protocolo de estresse leve crônico, possivelmente atuando por reduzir a atividade inflamatória pela via do inflamassoma NLRP3 (DENG et al. 2015).

Segundo Itawa et al. (2013), a atividade exacerbada desse inflamassoma promovida por um quadro de estresse persistente pode acarretar em diversas doenças tanto sistêmica quanto centrais, a exemplo de hipertensão e depressão. Em pacientes depressivos, observa-se um aumento nos níveis de IL-18 e IL-1 β , sugerindo que a via de produção deles, pelo inflamassoma NLRP3 está alterada, fato que é demonstrado por Deng (2015).

Dessa forma, uma possível via de atuação farmacológica seria inibir a inflamação observada periféricamente e a nível de SNC em caso de pacientes com transtorno depressivo maior. Em estudo de Assis (2016), foi vista uma possível atividade inflamatória na segunda fase do teste da formalina. Assim sendo, suspeita-se que o 2-alilfenol possa agir como um possível antidepressivo.

3. OBJETIVOS

Geral

Avaliar a atividade antidepressiva do fenilpropanoide 2-alilfenol no modelo de depressão promovida pelo estresse subcrônico imprevisível (ESI) em camundongos machos.

Específico

- Induzir o comportamento do tipo depressivo com o protocolo ESI em camundongos machos;
- Investigar os efeitos do 2-alilfenol, aplicado diariamente por uma semana, no sistema nervoso central
- Acompanhar a evolução ponderal e a ingestão de comida por parte dos animais;
- Testar se a aplicação do ESI ou a administração prolongada do 2-alilfenol altera a atividade locomotora espontânea;
- Avaliar a atividade antidepressiva do 2-alilfenol por meio dos testes comportamentais de suspensão de cauda e de borrifagem de sacarose.

4. METODOLOGIA

4.1 Animais

Foram utilizados camundongos (*Mus musculus*) Swiss machos, em torno de dois meses de vida, com peso entre 20-35 gramas, oriundos do Biotério Professor Thomas George, pertencente ao Instituto de Pesquisa de Fármacos e Medicamentos (IPeFarM), localizado na Universidade Federal da Paraíba (UFPB).

Duas salas diferentes foram usadas para alojar os animais, uma onde estariam os animais que seriam submetidos ao protocolo de estresse subcrônico imprevisível e outra onde se encontrariam os animais controle em relação ao estresse. Ambos os ambiente foram mantidos a temperatura de $22\pm 1^{\circ}\text{C}$ com ciclo claro/escuro de 12 horas. Os animais foram alojados em gaiolas de polietilenos, com limite de 5 camundongos por caixa que receberam água e ração livremente durante todo o experimento.

Os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com as recomendações da Lei 11.794 de 08/10/2009, Lei Arouca, e devidamente aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal da Paraíba, sob número de protocolo 046/2016.

4.2 Drogas

Os animais que foram submetidos ao protocolo de estresse subcrônico imprevisível foram divididos em três grupos de tratamento:

- O controle negativo (oito camundongos) recebeu por via intraperitoneal (i.p) salina (0,9% w/v de cloreto de sódio) em uma concentração de 0,1ml/kg de animal;
- O controle positivo (oito camundongos) recebia a droga padrão, pamoato de imipramina (Novartis Biociências, São Paulo, Brasil), dissolvida em solução salina e administrada por via oral (v.o) em uma dose de imipramina de 15 mg/kg (DHINGRA & BANSAL, 2014).
- Terceiro grupo de tratamento (24 camundongos) recebeu a droga de interesse, 2-alilfenol (Sigma), solubilizada em salina com auxílio do

solvente tween 80 (polisorbato 80) e administrada via intraperitoneal (i.p) nas doses de 50, 75 e 100 mg/kg (ASSIS, 2016).

O tratamento dos três grupos se iniciou nos últimos sete dias do protocolo de ESI.

Ainda tivemos o grupo sem estresse, que não foi submetido ao protocolo de estresse subcrônico imprevisível.

4.3 Métodos

4.3.1 Procedimento Experimental

O modelo de estresse subcrônico imprevisível utilizado consistiu de aplicação de dois a três estressores diários, ocorrendo de forma aleatória, imprevisível e contínua por 14 dias, sendo este embasado nos protocolos previamente demonstrados por Moretti et al. (2012) e Deng et al. (2015).

Os camundongos, já separados em seus respectivos grupos, passaram um período de 5 dias de adaptação ao ambiente laboratorial e no sexto dia, 1º dia de aplicação dos estressores, os animais que seriam submetidos ao protocolo de ESI foram isolados do grupo controle negativo, ou seja, dos animais que não receberiam estresse algum, e eram transferidos para uma nova sala. Como demonstrado na linha do tempo experimental, Figura 11, a partir do 13º dia, os 32 animais que eram submetidos ao ESI começaram a receber seus respectivos tratamentos, podendo ser salina a 0,9% (i.p), imipramina a 15 mg/kg (v.o) e o fenilpropanoide 2-alilfenol nas doses de 50, 75 e 100 mg/kg. A administração do tratamento ocorreu no mesmo horário até o 19º dia do protocolo. Ao 20º dia eram realizados os testes comportamentais e posteriormente eram eutanasiados por guilhotina.

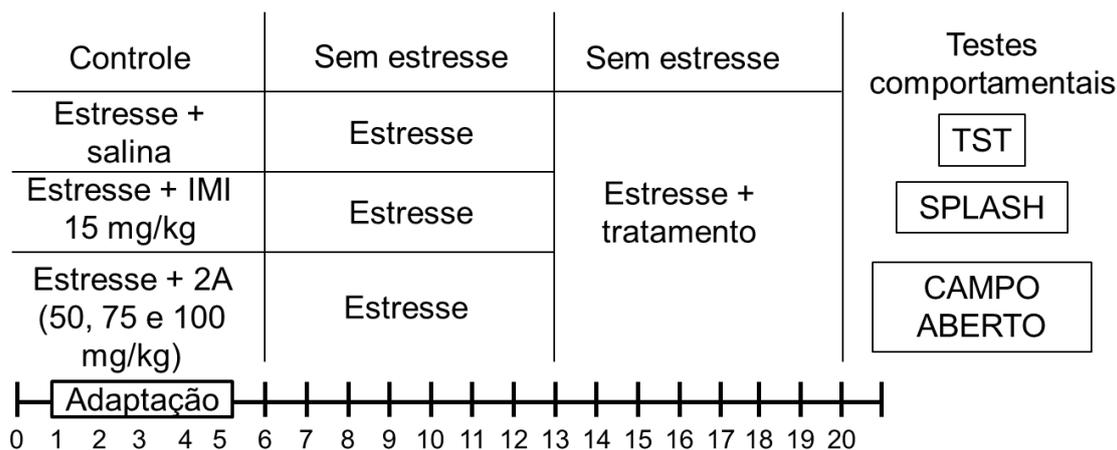


Figura 11- Linha do tempo do protocolo de estresse subcrônico imprevisível. Legenda: imipramina (IMI); 2-alilfenol (2A); teste de suspensão de cauda (TST).

Na Tabela 5, observa-se os estressores escolhidos para protocolo de ESI de acordo com dados relatados na literatura (FRANCESHELLI et al., 2014; MORETTI et al, 2012; DENG et al, 2015; CARNEIRO, 2017), ocorrendo adaptações para se adequarem as condições do laboratório.

Tabela 4 - Estressores aplicados durante o período de estresse subcrônico imprevisível com suas respectivas descrições

Estressor	Descrição
Nado Frio	Um volume de 650 mL de água com temperatura em torno de $15\pm 1^{\circ}\text{C}$ era adicionado no béquer de capacidade de 1000 mL, onde o animal posteriormente era colocado por 10 minutos. Entre cada animal, a água era desprezada e o aparato lavado para próxima rodada.
Choque inescapável	O animal era colocado em uma caixa Skinner (50 X 25 X 25 cm), que contém barras paralelas de cobre capazes de conduzir corrente elétrica e infringir leves choques, e a cada 10 segundos recebiam uma corrente elétrica de 0,7 mA durante um tempo total de 3 minutos.
Mudança de sala	Para substituição da averiguação do ciclo estral, propomos o estresse de modificação de ambiente que ocorre no primeiro dia, onde o animal é transferido de uma sala onde já está adaptado para um outro ambiente novo.
Oscilação de caixa	As caixas de polietileno foram gentilmente osciladas por um período de 10 minutos
Superlotação de caixa	O número de animais contidos nas gaiolas ia

	de 5, o padrão, para 7 a 9 por um período de 12 ou 24 horas. Animais da mesma ninhada foram agrupados entre si para evitar confronto.
Contenção	Foram alojados em pequenos potes de politereftalato de etileno (PET) de 11 cm de diâmetro e 5 cm de profundidade, a fim de restringir seus movimentos por um período de 1 hora.
Inclinação da caixa a 45°	As gaiolas eram elevadas com suporte de madeira a um ângulo de 45°, fazendo-se uso de um transferidor para averiguar a angulação. Esse protocolo tinha duração de 12 ou 24 horas.
Maravalha molhada	A maravalha foi pesada e posteriormente adicionada água em uma proporção de 2:1 (maravalha/água). Os camundongos então eram transferidos para essa nova caixa e mantidos por um tempo de 12 ou 24 horas.
Som do predador	O som de um animal selvagem foi colocado por um período de 8 a 12 horas.
Temperatura quente	O sistema de resfriamento da sala era desligado, permitindo a mesma atingir uma temperatura de $29 \pm 1^\circ\text{C}$. O tempo transcorrido entre ligar e desligar variou de 12 a 24 horas
Temperatura fria	O sistema de resfriamento da sala era potencializado, permitindo a mesma atingir uma temperatura de 17°C . O tempo transcorrido entre ligar e desligar variou de 12 a 24 horas
Iluminação noturna	Durante o período noturno, as luzes eram mantidas acessas.
Troca do ciclo claro/escuro	Os camundongos permaneceram com as luzes acessas durante a noite enquanto que durante o dia, as luzes eram desligadas. Esse protocolo durava 24 horas.

No vigésimo dia é realizado os testes comportamentais com todos os animais. Os testes realizados seguem a sequência de teste da suspensão de cauda, posteriormente realizado o teste do splash e por fim o teste do campo aberto.

Durante o período do estresse, foram aplicados de dois a quatro estressores diários, em horários predeterminados, zelando pelo bem estar animal.

4.3.2 Triagem farmacológica comportamental

A partir do 13^o dia de protocolo, juntamente com o início do tratamento dos animais estressados, se realizou a 1^a triagem farmacológica comportamental (ALMEIDA, 2006) com a finalidade de averiguar a toxicidade da administração crônica do 2-alilfenol. Ao total, sendo realizadas quatro triagens farmacológicas comportamentais, nos dias 13, 15, 17 e 19.

4.3.3 Avaliação da evolução ponderal

Comida e água foram oferecidos *ad libitum* durante todo o procedimento, desde o período de adaptação até serem realizados os teste comportamentais, sendo aferido o peso de todos os animais a cada dois dias em horário fixo e precedendo a aplicação dos tratamentos. Também foi mensurado a ingestão de ração pelos grupos diariamente.

4.3.4 Teste de suspensão de cauda

Os camundongos foram suspensos a uma altura de 50 cm do chão e presos pela cauda com auxílio de fita adesiva, a aproximadamente 1 cm da ponta final da mesma (PALUCHA-PONIEWIERA et al., 2014). O tempo total de teste foi de 6 minutos por animal, sendo esse período totalmente utilizado nas análises (STERU et al., 1985). Os critérios a serem analisados foram: latência para a imobilidade e tempo total de imobilidade.

4.3.5 Teste de borrifagem de sacarose (splash)

Esse teste é baseado na borrifagem de uma mistura homogênea de água mais sacarose a 10% no dorso dos animais. Essa solução por ser viscosa gera uma sensação de desasseio, por consequência o animal inicia um comportamento de *grooming* que significa o comportamento de autolimpeza, seja por lambidas ou coçadas (YALCIN et al., 2005). Os critérios analisados durante os seis minutos de vídeo foram: latência e tempo de *grooming* (ROSA, 2014).

4.3.6 Teste do campo aberto

O aparato para este teste é feito de polietileno com medidas de 40x60x50 cm de altura e sua base constituía de uma área circular subdividida em 12 quadrados de mesma área. Os animais eram alojados no centro do aparato após a filmagem ser iniciada e foi contato cinco minutos após o início do teste, tendo intenção de avaliar o caráter exploratório e a locomoção dos animais. Os parâmetros analisados eram: percentagem do tempo total que os animais passam nos quadrantes centrais; latência para *rearing* (1º levantamento); número de *rearing*; número de cruzamentos, sendo o critério de três patas em um mesmo quadrante para se considerar um cruzamento (ALMEIDA, 2006).

4.3.7 Gravação e análise dos vídeos

Os testes comportamentais realizados foram gravados com auxílio de uma câmera Nikon Coolpix P530. Os vídeos obtidos foram editados por meio do programa Animotica – Vídeo Editor da Mixilab para se obter a visualização única e exclusiva de um animal por vídeo no tempo indicado por cada teste. Então, um voluntário não envolvido com a pesquisa, renomeou os arquivos com códigos, mantendo a relação do nome original com o código em uma tabela no Excel. Posteriormente, os vídeos editados eram analisados por 2 avaliadores diferentes, afim de analisarem e registrarem os comportamentos dos animais. Caso os valores obtidos da análise dos 2 avaliadores diferissem de forma significativa, o vídeo era analisado pela 3ª vez e o valor da média era obtida dos dois valores mais próximos.

Após realizada toda a análise dos vídeos e a análise estatísticas, o pesquisador tinha acesso a tabela do Excel com a correlação do nome com o código.

4.3.8 Análise estatística

Os dados demonstrados neste trabalho são apresentados como média \pm erro padrão da média. Os dados foram primeiramente submetidos ao teste de Shapiro para avaliar a normalidade. Em seguida, foi feita a comparação dos grupos por meio do teste ANOVA, seja de uma ou de duas vias, realizando o *post-hoc* de Dunnet,

Bonferroni ou Tukey. Foram considerados significativos os valores de $p < 0,05$. As análises foram realizadas pelo software Graphpad Prism®.

5. RESULTADOS

Triagem farmacológica

A triagem foi realizada logo no primeiro dia e repetido mais três vezes até os testes comportamentais serem realizados. As tabelas preenchidas referentes aos grupos e dias se encontram no apêndice deste trabalho.

Foi observado que na primeira aplicação do 2-alilfenol, o fenilpropanoide apresentou atividade analgésica na dose de 50 mg/kg nas checagens de 30, 60 e 120 minutos, na dose 75 mg/kg até do 60 minutos e na dose de 100 mg/kg nos primeiros 30 minutos. Entretanto essa atividade não foi mais vista nas demais triagens, ou seja, na administração prolongada da droga

Na segunda triagem farmacológica, realizada no 15^o dia de protocolo, a piloereção foi observada nos animais tratados na dose de 50 mg/kg de 2-alilfenol no tempo de 30 minutos enquanto que tal efeito foi observado na dose de 75 mg/kg até os 180 minutos e a dose de 100 mg/kg no tempo de 60 minutos. Além disso, os animais tratados na dose de 100 mg/kg demonstraram redução na força para agarrar na primeira checagem, a de 30 minutos.

No 17^o dia de protocolo, realizou-se a terceira triagem, observou-se que ao tempo dos 120 minutos em todas as doses administradas de 2-alilfenol (50, 75 e 100 mg/kg), houve uma perda do reflexo corneal que não foi vista mais até o final do protocolo. Além disso, a piloereção também foi observada na checagem dos 30 minutos na dose de 75 mg/kg do 2-alilfenol.

Na última triagem farmacológica, todas as doses de 2-alilfenol apresentaram o efeito de piloereção, variando o tempo conforme a dose. A dose de 50 mg/kg gerou tal efeito a partir dos 120 minutos até os 240 minutos, última checagem realizada. Enquanto isso, tanto a dose de 75 mg/kg quanto a de 100 mg/kg apresentaram piloereção durante todas as checagens (30, 60, 120, 180 e 240 minutos).

Além disso, também na quarta triagem farmacológica comportamental, foi visto que os animais que recebiam as doses de 75 e 100 mg/kg do fenilpropanoide 2-alilfenol, demonstraram uma contração da musculatura abdominal nos tempos de 60 e 120 segundos.

Avaliação da evolução ponderal

A avaliação do peso dos animais foi feita desde o primeiro dia até o final do protocolo. Como está demonstrado na Figura 12, percebe-se que não há alterações estatísticas entre os grupos durante a evolução do protocolo.

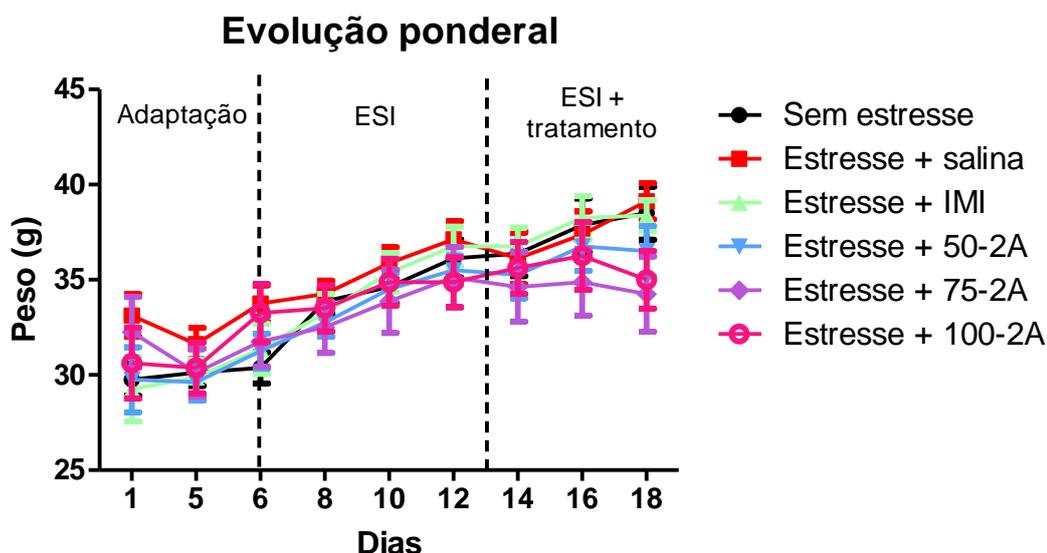


Figura 12 - Dados da análise ponderal ao decorrer do protocolo de estresse subcrônico imprevisível (n=8). ANOVA “medidas repetidas” teste de Bonferroni.

Entretanto, no 18º dia, se nota uma redução não estatística do peso, quando comparado ao grupo estresse + salina, os grupos que passaram pelo estresse e receberam as doses de 2-alilfenol nas concentrações de 75 mg/kg ($34,3 \pm 2,0$, n=8, vs. $38,4 \pm 0,8$, n=8) e 100 mg/kg ($35 \pm 1,5$, n=8, vs. $38,4 \pm 0,8$, n=8).

Teste de suspensão de cauda

Nesse teste foram observados dois parâmetros para análise: latência para imobilidade e tempo de imobilidade. O primeiro sendo observado na Figura 13-A.

A latência para a imobilidade teve uma redução estatística nos animais submetidos ao ESI que receberam o veículo em relação ao grupo sem estresse ($92,00 \pm 6,5$, n=8, vs. $137,8 \pm 12$, n=8). O tratamento tanto com a imipramina quanto com o fenilpropanoide, nas doses de 50, 75 e 100 mg/kg, não foram capazes de restaurar essa latência (IMI: $97,14 \pm 7,0$, n=8, vs. $92,00 \pm 6,5$, n=8; 50-2A: $100,0 \pm$

18,7, n=8, vs. $92,00 \pm 6,5$, n=8; 75-2A: $106,1 \pm 12,8$, n=8, vs. $92,0 \pm 6,5$, n=8; 100-2A: $131,2 \pm 18,7$, n=8, vs. $92,0 \pm 6,5$, n=8).

Entretanto o tempo de imobilidade aferido no teste, mostrou-se estatisticamente aumentado no grupo estresse + salina quando comparado ao grupo sem estresse ($81,6 \pm 6,2$, n=8, vs. $45,4 \pm 8,1$, n=8) como observado na Figura 13-B. O tratamento tanto com imipramina quanto com o 2-alilfenol em todas as doses foram eficientes em reduzir o tempo de imobilidade quando comparados ao grupo estresse + salina (IMI: $44,4 \pm 4,3$, n=8, vs. $81,6 \pm 6,2$, n=8; 50-2A: $56,7 \pm 7,4$, n=8, vs. $81,6 \pm 6,2$, n=8; 75-2A: $52,3 \pm 7,9$, n=8, vs. $81,6 \pm 6,2$, n=8; 100-2A: $38,1 \pm 5,1$, n=8, vs. $81,6 \pm 6,2$, n=8).

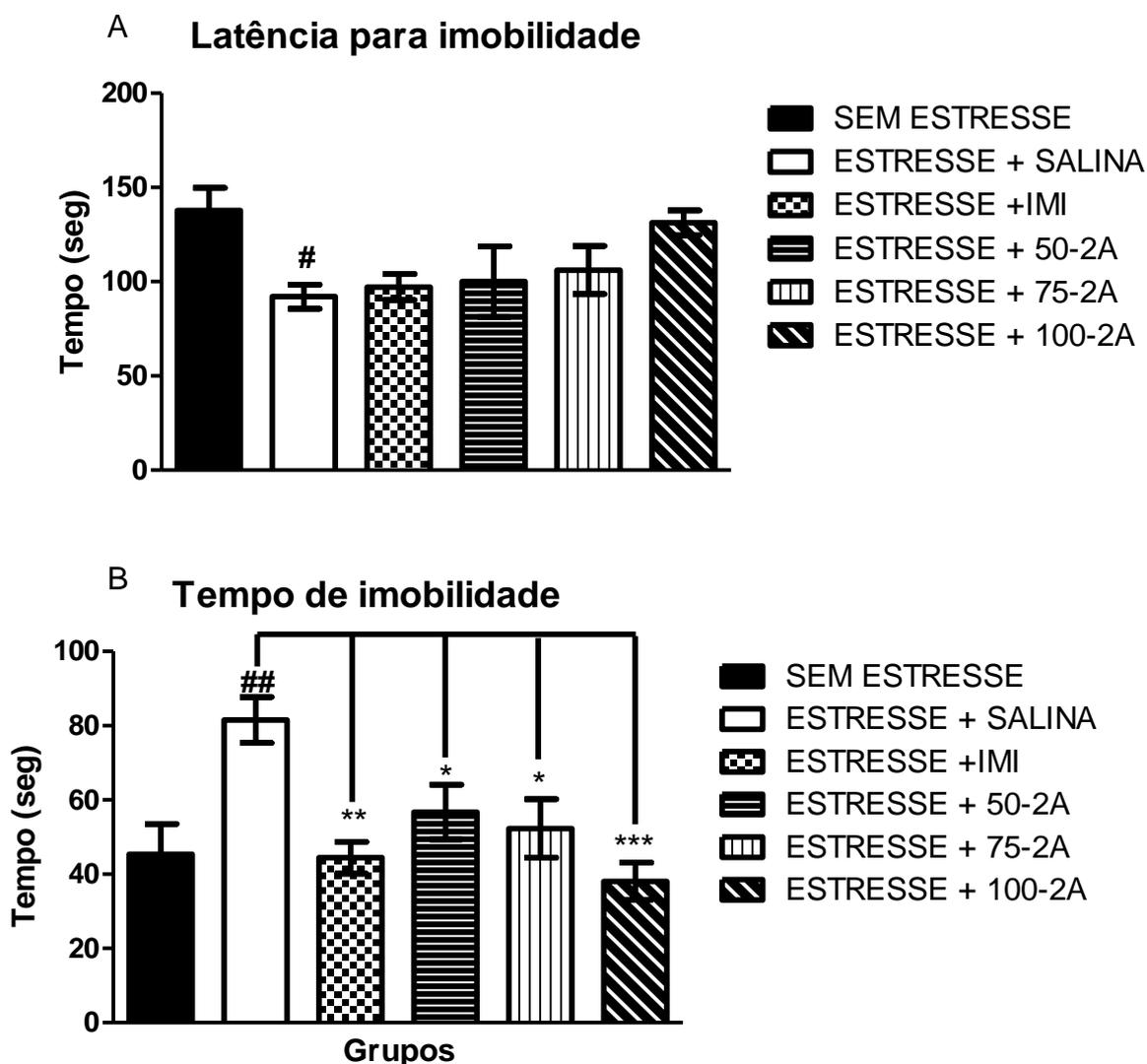


Figura 13 – Latência para imobilidade (A). Tempo de imobilidade (B). # $p < 0,05$ em relação ao sem estresse. ## $p < 0,01$ em relação ao sem estresse. * $p < 0,05$ em relação ao estresse+salina; ** $p < 0,01$ em comparação estresse+salina; *** $p < 0,001$ em comparação ao estresse+salina. ANOVA “one way” seguido pelo teste post hoc Dunnett (n=8)

Teste de borrifagem de sacarose (splash test)

Os parâmetros observados nesse teste foram: a latência para o início do *grooming* (autolimpeza) e o tempo de *grooming* e foram demonstrados na Figura 14. Com relação a latência (Figura 14 A), observa-se que não houve diferença estatística entre o grupo sem estresse e o grupo estresse + salina ($62,00 \pm 5,1$, $n=8$, vs. $51,8 \pm 3,2$, $n=8$). Entretanto, viu que o tratamento com 2-alilfenol na dose de 75 mg/kg foi responsável por reduzir essa latência em relação ao grupo estresse + salina ($42,9 \pm 5,8$, $n=8$, vs. $62,0 \pm 5,0$, $n=8$).

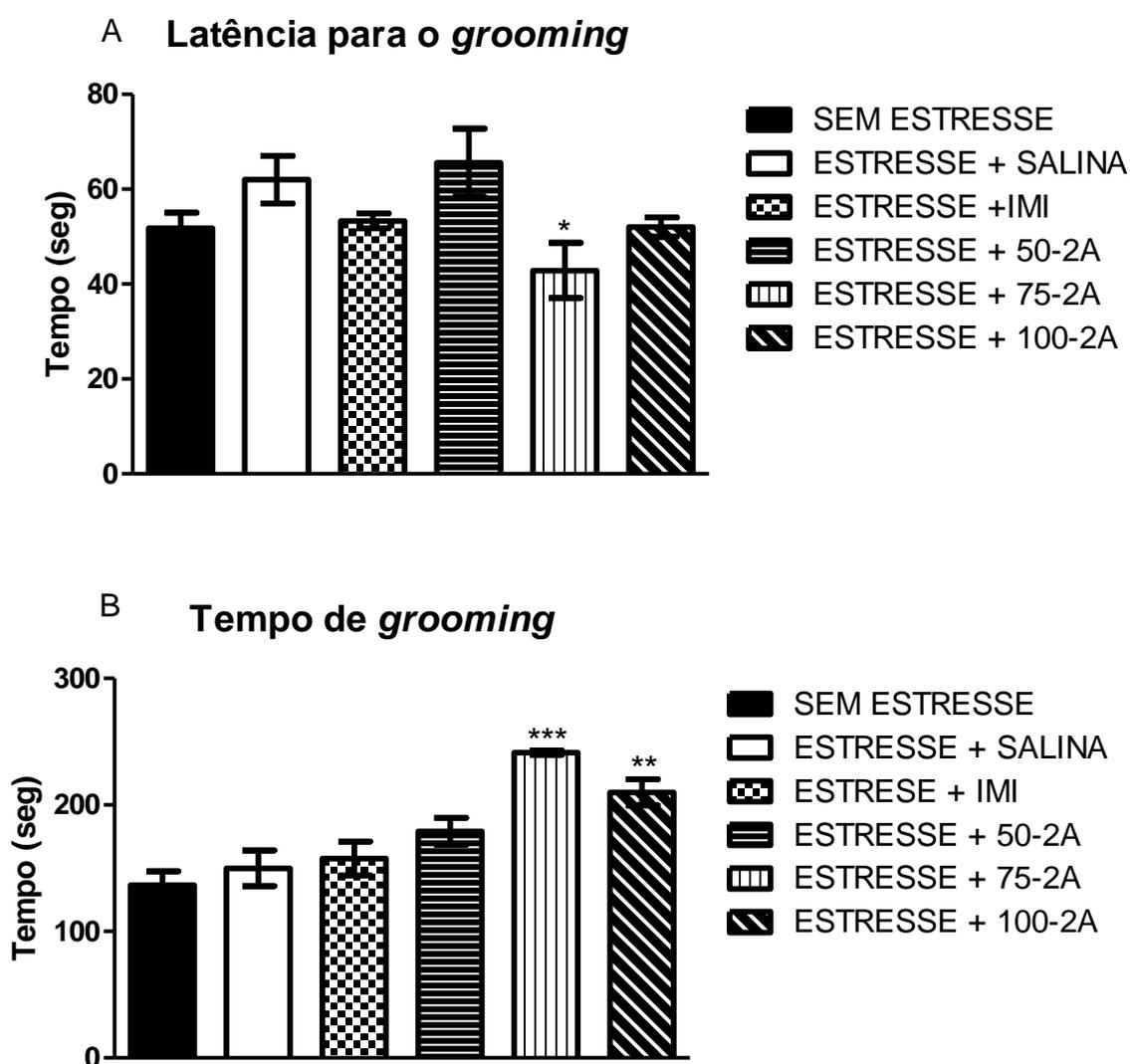


Figura 14 - Latência para *grooming*. * $p < 0,05$ em relação ao grupo estresse + salina. Tempo de *grooming* (B). ** $p < 0,01$ em relação ao grupo estresse + salina; *** $p < 0,001$ em relação ao grupo estresse + salina. ANOVA "one way" seguido pelo teste post hoc Dunnett ($n=8$).

Com relação ao tempo de autocuidado (*grooming*), visto na Figura 15 B, o protocolo ESI não gerou uma diferença entre os grupos sem estresse com o estresse + salina ($150,0 \pm 14,1$, $n=8$, vs. $136,7 \pm 10,9$, $n=8$). O tratamento com imipramina nem com 2-alilfenol na dose de 50 mg/kg geraram diferença com o grupo que recebia o veículo (IMI: $157,7 \pm 13,4$, $n=8$, vs. $150,0 \pm 14,1$, $n=8$; 50-2A: $179,0 \pm 10,8$, $n=8$, vs. $150,0 \pm 14,1$, $n=8$) Entretanto, o tratamento com 2-alilfenol demonstrou um aumento significativo no tempo de *grooming*, quando comparado ao estresse + salina, nas doses de 75 e 100 mg/kg (75-2A: $241,4 \pm 1,7$, $n=8$ vs. $150,0 \pm 14,1$, $n=8$; 100-2A: $210,0 \pm 10,3$, $n=8$, vs. $150,0 \pm 14,1$, $n=8$).

Teste do campo aberto

Os parâmetros observados foram percentagem de tempo no centro do campo, latência para o *rearing* (levantamento), número de *rearing* e número de cruzamentos. Com relação ao primeiro parâmetro (Figura 15 A) não foi observada qualquer diferença estatística entre os grupos. Os dados obtidos são apresentados a seguir: sem estresse ($9,4 \pm 0,8$, $n=8$, vs. $13,6 \pm 1,0$, $n=8$), imipramina ($13,59 \pm 2,1$, $n=8$, vs. $9,4 \pm 0,8$, $n=8$), 2-alilfenol 50 mg/kg ($11,90 \pm 1,9$, $n=8$, vs. $9,4 \pm 0,8$, $n=8$), 2-alilfenol 75 mg/kg ($12,34 \pm 1,3$, $n=8$, vs. $9,4 \pm 0,8$, $n=8$) e 2-alilfenol 100 mg/kg ($14,94 \pm 1,9$, $n=8$, vs. $9,4 \pm 0,8$, $n=8$).

Com relação a latência para o *rearing* (Figura 15 B), observou-se que o grupo que recebia estresse e era tratado com 2-alilfenol a 75 mg/kg teve uma redução quando comparado ao grupo estresse + salina ($19,5 \pm 1,4$, $n=8$, vs. $33,5 \pm 4,6$, $n=8$). Os demais grupos não apresentaram diferença estatística: sem estresse ($33,5 \pm 4,6$, $n=8$, vs. $27,7 \pm 2,9$, $n=8$), imipramina ($24,57 \pm 3,6$, $n=8$, vs. $33,5 \pm 4,6$, $n=8$), 2-alilfenol 50 mg/kg ($23,3 \pm 1,2$, $n=8$, vs. $33,5 \pm 4,6$, $n=8$) e 2-alilfenol 100 mg/kg ($22,8 \pm 2,6$, $n=8$, vs. $33,5 \pm 4,6$, $n=8$).

O número de *rearing* (Figura 15 C) se encontrou reduzido em animais que foram submetidos ao estresse e receberam o veículo quando comparados aos animais pertencentes ao grupo sem estresse ($31,2 \pm 3,0$, $n=8$, vs. $41,1 \pm 1,5$, $n=8$). Tal comportamento foi revertido quando os animais receberam o tratamento com imipramina ($41,8 \pm 0,9$, $n=8$, vs. $31,2 \pm 3,0$, $n=8$) e 2-alilfenol na concentração de 50 mg/kg ($41,1 \pm 2,2$, $n=8$, vs. $31,2 \pm 3,0$, $n=8$), mas não quando eram tratados com 2-

alilfenol nas doses de 75 mg/kg ($28,3 \pm 1,8$, $n=8$, vs. $31,2 \pm 3,0$, $n=8$) e 100 mg/kg ($33,1 \pm 3,5$, $n=8$, vs. $31,2 \pm 3,0$, $n=8$).

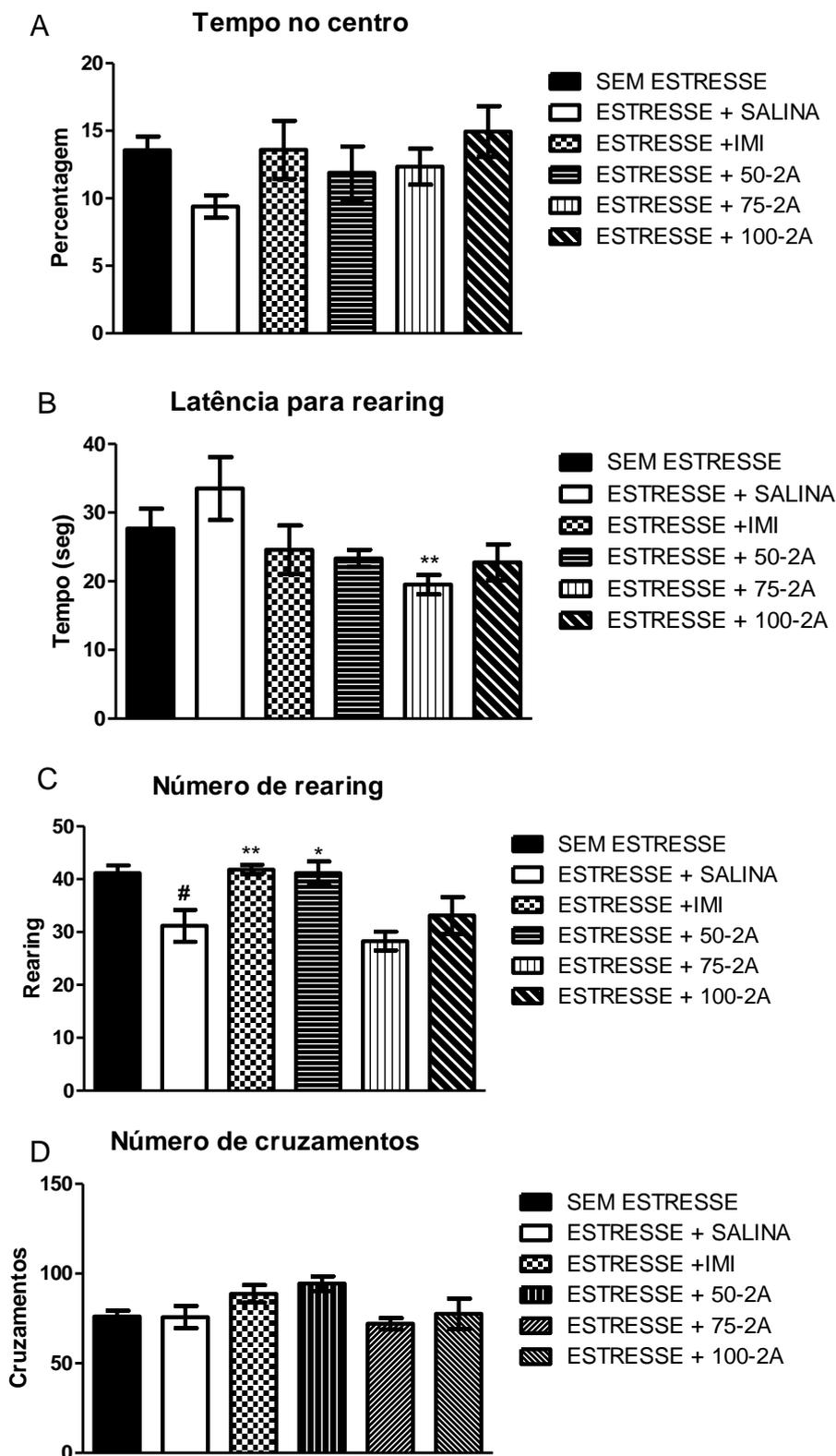


Figura 15 - Dados obtidos da análise do teste de campo aberto. Percentual de tempo no centro (A). Latência para rearing (B); ** $p < 0,01$ em relação ao estresse + salina. Número de rearing (C); #

p<0,05 em relação ao sem estresse; * p<0,05 em relação ao estresse + salina; ** p<0,01 em relação ao estresse + salina. Número de cruzamentos (D). ANOVA “one way” seguido pelo teste post hoc Dunnett (n=8).

Com relação ao número de cruzamentos (Figura 15 D) não foi observada diferenças estatísticas entre qualquer um dos grupos. Sem estresse ($76,0 \pm 3,3$, n=8, vs. $75,7 \pm 6,2$, n=8), imipramina ($88,67 \pm 4,9$, n=8, vs. $75,7 \pm 6,2$, n=8), 2-alilfenol nas doses de 50 mg/kg ($94,43 \pm 4,1$, n=8, vs. $75,7 \pm 6,2$, n=8), 75 mg/kg ($72,00 \pm 3,2$, n=8, vs. $75,7 \pm 6,2$, n=8) e 100 mg/kg ($77,57 \pm 8,5$, n=8, vs. $75,7 \pm 6,2$, n=8).

6. DISCUSSÃO

Os nossos resultados indicam que o protocolo de estresse subcrônico imprevisível promoveu um comportamento do tipo depressivo, por reduzir a latência para imobilidade e aumentar o tempo de imobilidade no teste de suspensão de cauda, e uma redução da capacidade exploratória, observado no número de *rearing*, sem alterar o comportamento de autocuidado (*grooming*), nem influenciar a atividade ambulatória espontânea dos animais.

O tratamento com o fenilpropanoide 2-alilfenol se mostrou eficiente em reverter esse comportamento do tipo depressivo, por restaurar o tempo de imobilidade no teste da suspensão de cauda e melhorar o comportamento de *grooming*, além de não alterar a atividade locomotora dos animais.

Alterações no peso são esperadas em protocolos que geram o comportamento do tipo depressivo (YAMADA, MOGAMI, HATTORI, 2017). Sendo a modificação na massa corporal sem a presença de dieta um dos critérios para diagnóstico do transtorno depressivo maior de acordo com DSM-5.

De maneira geral, demonstram-se que o comportamento de perda ou ganho de peso é o costumeiramente observado no protocolo de estresse crônico (CARNEIRO, 2017; MONTEIRO et al. 2015; ROLAND, ANTELMAN, 1976.; SANGHEZ et al., 2013). Estudos sugerem que essa divergência de resultados ocorra devido a diferentes vias envolvidas e que podem ter influência da duração do protocolo, sendo a hiperfagia e ganho de peso mais observados em protocolos de estresse crônico e a perda em outros tipos de protocolos com aplicação de estressores (RAZZOLI, BARTOLOMUCCI, 2016). Uma das vias associada com a diminuição da alimentação e a perda de peso envolvem a capacidade do CRF se ligar aos seus possíveis receptores, CRFR1 e CRFR2, no sistema nervoso central (HARRIS, 2015).

Entretanto estudos demonstram que essa alteração pode não ocorrer no protocolo de estresse subcrônico imprevisível, sem invalidar a eficácia da técnica para promover um comportamento do tipo depressivo (MORETTI et al. 2012; YAN et al., 2017).

Um outro ponto a ser observado é a redução não estatística do peso nos 5 primeiros dias do protocolo seguido de ganho de massa corporal. Tal fato indicaria que há um processo de adaptação dos animais ao ambiente laboratorial.

Com relação ao ganho de massa corporal ao decorrer do tempo, não se observa diferença estatística entre os grupos. Isso sugere que nem os diferentes tipos de estressores nem suas combinações foram eficientes em promover uma redução do peso nos quatro grupos que foram submetidos ao protocolo ESI. Além disso, observa-se que o início do tratamento não gera alterações estatísticas em nenhum dos grupos que recebe a droga padrão ou teste com o grupo que, além do estresse, recebe o veículo.

Outro ponto que podemos observar é o fato das contrações abdominais que foram observadas na última triagem, podem estar relacionadas ao menor ganho de peso, mesmo que não estatístico, dos grupos 75-2A e 100-2A. A triagem farmacológica comportamental realizada pela metodologia de Almeida et al. (2006) teve por objetivo verificar o perfil de ação dos tratamentos no SNC e também uma possível toxicidade. Os dados mostram que o efeito mais comum relacionado à aplicação do fenilpropanoide foi a piloereção. Entretanto, as contrações abdominais vista na 4ª triagem, demonstram que a longo prazo a aplicação via intraperitoneal apresenta esse efeito. Estudos não clínicos demonstram que a via de administração influencia na biodisponibilidade e possível toxicidade de diferentes fármacos (POTTENGER et al., 2000; LIPINSKI et al., 2008; VIJAYARAGHAVAN et al., 2005).

Assim sendo, sugere-se que para tentar evitar tal efeito colateral, a melhor opção seria procurar demais vias de administração, verificando a capacidade de conseguir demonstrar os mesmos efeitos antidepressivos demonstrados nesse trabalho, fazendo um estudo mais aprofundado da possível toxicidade desse fenilpropanoide

O teste de suspensão da cauda, igualmente ao teste de nado forçado, é embasado e validado para averiguar o comportamento depressivo em camundongos (CRYAN, MOMBÉREAU, VASSOURT, 2005). Esse teste tenta averiguar o comportamento de luta/fuga dos animais submetidos a situações de estresse inescapáveis, sendo a imobilidade definida como uma desistência da fuga ou escape, caracterizada como maior em animais que apresentem um comportamento do tipo depressivo (CAN et al., 2012).

Os resultados obtidos a partir do teste de suspensão de cauda, sugerem que os animais que foram submetidos ao estresse e receberam o veículo no tratamento desenvolveram um comportamento do tipo depressivo, tendo em vista o aumento do tempo de imobilidade. Tal comportamento é observado em estudos com indução de

depressão por tratamento químico ou pela aplicação de protocolos de estresse (DAVID et al., 2010; MUTLU et al. 2012).

Apesar de não ser usualmente falado na literatura, a verificação da latência para imobilidade no teste de suspensão de cauda se mostra importante, tendo em vista que a averiguação de tal parâmetro pode servir como uma melhoria para validação preditiva de testes que façam uso do desespero comportamental (CASTAGNÉ et al., 2010; ARAÚJO, 2018). Observou-se que o protocolo se mostrou eficaz em reduzir tal parâmetro, mostrando a influência que o estresse tem sobre esse critério que já foi observado em fêmeas (CARNEIRO, 2017). Todavia, nenhum dos tratamentos demonstrou resultados significativos em restaurar tal aspecto, incluindo a droga padrão. Ou seja, apesar de poder ser importante para predizer a atividade antidepressiva de um fármaco, seus resultados negativos não invalidam nem se contrapõe aos dados de tempo de imobilidade observados nesse teste.

Um parâmetro observado também é o comportamento de autolimpeza, verificado através do teste de borrifagem de sacarose (*splah test*), onde se verifica a anedonia do animal. Na literatura, é descrito que animais que apresentam um comportamento do tipo depressivo demonstram um tempo de *grooming* inferior aos grupo controle (KALUEFF, TUOHIMAA, 2004; DENMARK et al., 2010).

Entretanto neste trabalho, o tempo total de *grooming* do grupo estresse+salina se encontrou similar ao grupo que não passava pelo protocolo ESI, resultado similar ao observado por Neis et al. (2016). Além disso, o tratamento com imipramina não mostrou resultados estatísticos para aumentar o tempo de grooming nem alterar a latência, fato que já foi demonstrado em experimentos de Carneiro (2017) com camundongos fêmeas *Swiss*.

Em contrapartida, animais que recebiam o tratamento com 2-alilfenol nas doses de 75 e 100 mg/kg foram eficazes em aumentar o tempo de *grooming* e apenas a dose de 75 mg/kg se mostrou eficiente em reduzir a latência para o *grooming*.

Observando todos os dados obtidos nesse teste, sugere-se que a aplicação repetitiva de estressores que acabavam por sujar os camundongos, como a maravalha molhada e a contenção, levaram a um condicionamento de autolimpeza. Como fundamentação para tal, já se sabe que os roedores tem um comportamento de autolimpeza característicos e evitam se manter sujos (KALUEFF et al., 2016). E o estímulo contínuo de sujeira através da aplicação dos estressores acabaria por acostumar os animais a esse hábito. E que, apesar de ter um nível basal alto, o

tratamento com 2-alilfenol ainda demonstrou ser eficiente em melhorar o tempo de *grooming* e a latência.

O teste de campo aberto permitem avaliar a atividade exploratório, ou seja a capacidade locomotora espontânea e do comportamento ansioso do animal, fornecendo indícios do estado emocional de roedores (CAROLA et al., 2002; BARBOSA, LIMA, 2016).

Com relação ao número de cruzamentos, nota-se que não houve diferença entre os grupos, corroborando o que vem sendo apresentado em vários trabalhos que avaliam o comportamento do tipo depressivo tanto com fêmeas quanto com machos (MORETTI ET AL. 2012; NEIS et al., 2016; CARNEIRO, 2017; CAVALCANTE et al., 2017). Tal dado demonstra que nem a aplicação dos estressores quanto os dois tipos de tratamento, com imipramina e 2-alilfenol nas diferentes doses, demonstrou qualquer alteração na atividade locomotora espontânea desses animais.

Trabalhos demonstram que animais com comportamento tipo depressivo apresentam um tempo ou atividade no centro do aparato menor do que o grupo controle (LOPATINA et al., 2014; CARNEIRO, 2017). Stanford (2007) afirma que animais que passaram maior tempo na região central do campo são considerados menos medrosos (ou "ansiosos") do que aqueles que preferem o perímetro. Apesar de não ser estatístico, observa-se uma redução no percentual de tempo no centro dos animais que eram submetido ao estressores e recebiam o tratamento com veículo em relação aos demais grupos.

No teste de campo aberto também foram observados a latência para o *rearing* e o tempo do mesmo. Considerando a latência, foi visto que o 2-alilfenol a 75 mg/kg foi a única dose do tratamento a apresentar uma diferença estatística com o grupo que recebia o veículo associado ao estresse, demonstrando um comportamento exploratório. Já foi demonstrando que aferindo tal parâmetro em fêmeas submetidas ao protocolo ESI, observou-se um aumento na latência entre o grupo sem estresse e o grupo que passava pelo estresse e recebia o veículo (CARNEIRO, 2017).

Nota-se que houve uma redução significativa do número de *rearing* no grupo de animais que passaram pelos estressores e receberam o veículo em relação ao grupo sem estresse, enquanto que o tratamento com imipramina e o 2-alilfenol na dose de 50 mg/kg foi eficiente em restaurar esse comportamento. Isso é um

indicativo que o protocolo de estresse subcrônico imprevisível tem uma atividade ansiogênica e reduz a capacidade exploratória.

Essa redução já vista na literatura em protocolos que promovem um comportamento do tipo depressivo (PECHLIVANOLA et al., 2010; PAULUS, GEYER 1993). Britton et al. (1982) demonstraram que aplicação de CFR promovia uma redução no número de *rearing* e isso demonstra a ligação direta da desregulação do eixo HPA e o número de *rearing*. Estudos descrevem essa desregulação no comportamento depressivo promovido por estresse crônico, embasando assim a instauração do comportamento do tipo depressivo pelo protocolo aqui apresentado (REICH, TAYLOR, MCCARTHY, 2009).

7. CONCLUSÃO

Protocolo ESI pode promover o comportamento do tipo depressivo em camundongos *Swiss* machos. A evolução ponderal dos animais não foi diferente entre os grupos. O tratamento com 2-alifenol aplicado por uma semana mostrou efeitos colaterais observados na triagem farmacológica comportamental.

Tanto o protocolo ESI quanto o tratamento com 2-alifenol não alterou a atividade locomotora dos animais. Entretanto, o tratamento subcrônico com o fenilpropanoide foi eficaz em reverter o comportamento do tipo depressivo, sendo a melhor dose a de 75 mg/kg.

8. REFERÊNCIAS

ABBASI, Seyed-Hesameddin et al. Effect of celecoxib add-on treatment on symptoms and serum IL-6 concentrations in patients with major depressive disorder: randomized double-blind placebo-controlled study. **Journal of affective disorders**, v. 141, n. 2, p. 308-314, 2012

ALBERT, Paul R. Why is depression more prevalent in women?. **Journal of psychiatry & neuroscience: JPN**, v. 40, n. 4, p. 219, 2015.

AGID, Ofer; KOHN, Yova; LERER, Bernard. Environmental stress and psychiatric illness. **Biomedicine & pharmacotherapy**, v. 54, n. 3, p. 135-141, 2000.

ALMEIDA, R. N.; OLIVEIRA, T. M. L. Triagem farmacológica comportamental. **ALMEIDA, RN Psicofarmacologia: fundamentos práticos, 1ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan**, p. 131-137, 2006

ARAUJO, A.N.V. *Investigação da atividade antidepressiva do orto-eugenol em modelos comportamentais de depressão induzidos por dexametasona*. Tese (Mestrado em Neurociência cognitiva e comportamental – Neurociência pré-clínica e clínica) – Centro de Ciências Humanas, Letras e Artes, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2018.

ASIS, D.B. *Efeito antinociceptivo do fenilpropanoide 2-alilfenol*. Tese (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos e Bioativos – Farmacologia) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2016.

BARBOSA, Daniel Fernandes; LIMA, Carleuza Francisca de. EFEITOS DO EXERCÍCIO FÍSICO EM COMPORTAMENTOS RELACIONADOS COM A ANSIEDADE EM RATOS. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 22, n. 2, p. 122-125, 2016.

BARTHOLOMEW, AA. An evaluation of tranlycypromine ("Parnate") in the treatment of depression. **The Medical journal of Australia**, v. 49, p. 655-662, 1962.

BENTLEY, S.M.; PAGALILAUAN, G.L.; SIMPSON, S.A. Major depression. **Medical Clinics**, v. 98, n. 5, p. 981-1005, 2014.

BINDA, Claudia et al. Structure of human monoamine oxidase B, a drug target for the treatment of neurological disorders. **Nature Structural and Molecular Biology**, v. 9, n. 1, p. 22, 2002.

BRAGA, Joana Carvalho Figueiredo Ferreira. Causas biológicas de depressão em doentes com Lúpus Eritematoso Sistémico: um estudo de revisão. 2014.

BRETANHA, Andréia Ferreira et al. Sintomas depressivos em idosos residentes em áreas de abrangência das Unidades Básicas de Saúde da zona urbana de Bagé, RS. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 18, p. 1-12, 2015.

BRITTON, D. R. et al. Intraventricular corticotropin-releasing factor enhances behavioral effects of novelty. **Life sciences**, v. 31, n. 4, p. 363-367, 1982.

BROWN, R. S.; BOTTOMLEY, W. K. Utilization and mechanism of action of tricyclic antidepressants in the treatment of chronic facial pain: a review of the literature. **Anesthesia progress**, v. 37, n. 5, p. 223, 1990.

CAN, Adem et al. The tail suspension test. **Journal of visualized experiments: JoVE**, n. 59, 2012.

CAVALCANTE, Giuliana Ignácio Teixeira et al. HIV antiretroviral drug Efavirenz induces anxiety-like and depression-like behavior in rats: evaluation of neurotransmitter alterations in the striatum. **European journal of pharmacology**, v. 799, p. 7-15, 2017

CARNEIRO, Cesar Alves. Padronização de um modelo de estresse subcrônico imprevisível, para indução da depressão. 60 f. Trabalho de conclusão de curso (Dissertação) – Curso de Graduação em Farmácia, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2017.

CAROLA, Valeria et al. Evaluation of the elevated plus-maze and open-field tests for the assessment of anxiety-related behaviour in inbred mice. **Behavioural brain research**, v. 134, n. 1-2, p. 49-57, 2002.

CASSANO, Paolo; FAVA, Maurizio. Depression and public health. **Journal of psychosomatic research**, v. 53, n. 4, p. 849-857, 2002.

CHANNON, Shelley; BAKER, Jane E.; ROBERTSON, Mary M. Working memory in clinical depression: an experimental study. **Psychological Medicine**, v. 23, n. 1, p. 87-91, 1993.

COSTA, Cecilia; LODESANI, Marco; MAISTRELLO, Lara. Effect of thymol and resveratrol administered with candy or syrup on the development of *Nosema ceranae* and on the longevity of honeybees (*Apis mellifera* L.) in laboratory conditions. **Apidologie**, v. 41, n. 2, p. 141-150, 2010.

CRYAN, John F.; MOMBÉREAU, Cedric; VASSOUT, Annick. The tail suspension test as a model for assessing antidepressant activity: review of

pharmacological and genetic studies in mice. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 29, n. 4-5, p. 571-625, 2005.

DAVID, Denis J. et al. Behavioral effects of fluoxetine in an animal model of anxiety/depression are mediated by both neurogenesis-dependent and independent mechanisms. **Neuron**, v. 62, n. 4, p. 479, 2010.

DELITALA, Alessandro P. et al. Depressive symptoms, thyroid hormone and autoimmunity in a population-based cohort from Sardinia. **Journal of affective disorders**, v. 191, p. 82-87, 2016.

DENG, Xue-Yang et al. Thymol produces an antidepressant-like effect in a chronic unpredictable mild stress model of depression in mice. **Behavioural brain research**, v. 291, p. 12-19, 2015.

DHINGRA, D.; BANSAL, Y. Antidepressant-like activity of beta-carotene in unstressed and chronic unpredictable mild stressed mice. **Journal of Functional Foods**, v. 7, p. 425-434, 2014.

EVANS, Dwight L.; DAVIDSON, Jonathan; RAFT, David. Early and late side effects of phenelzine. **Journal of clinical psychopharmacology**, v. 2, n. 3, p. 208-210, 1982.

EYRE, Harris A. et al. A critical review of the efficacy of non-steroidal anti-inflammatory drugs in depression. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 57, p. 11-16, 2015

FAVA, Maurizio. Weight gain and antidepressants. **The Journal of clinical psychiatry**, v. 61, p. 37-41, 2000

FERLAND, Catherine E.; BEAUDRY, Francis; VACHON, Pascal. Antinociceptive Effects of Eugenol Evaluated in a Monoiodoacetate-induced Osteoarthritis Rat Model. **Phytotherapy research**, v. 26, n. 9, p. 1278-1285, 2012.

FIEDOROWICZ, Jess G.; SWARTZ, Karen L. The role of monoamine oxidase inhibitors in current psychiatric practice. **Journal of psychiatric practice**, v. 10, n. 4, p. 239, 2004.

FLECK, M. P. A.; BAEZA, F. L. C. Depressão. In: Duncan, BB et al. Medicina Ambulatorial: condutas de atenção primária baseadas em evidências. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013.

GARCIA, Grant H. et al. Depression symptomatology and anterior cruciate ligament injury: incidence and effect on functional outcome—a prospective cohort study. **The American journal of sports medicine**, v. 44, n. 3, p. 572-579, 2016

GERBER, P.D. et al. The relationship of presenting physical complaints to depressive symptoms in primary care patients. **Journal of General Internal Medicine**, v. 7, n. 2, p. 170-173, 1992.

GRAGNOLI, Claudia. Depression and type 2 diabetes: cortisol pathway implication and investigational needs. **Journal of cellular physiology**, v. 227, n. 6, p. 2318-2322, 2012.

HOLSBOER, Florian; ISING, Marcus. Central CRH system in depression and anxiety—evidence from clinical studies with CRH1 receptor antagonists. **European journal of pharmacology**, v. 583, n. 2-3, p. 350-357, 2008.

IWATA, Masaaki; OTA, Kristie T.; DUMAN, Ronald S. The inflammasome: pathways linking psychological stress, depression, and systemic illnesses. **Brain, behavior, and immunity**, v. 31, p. 105-114, 2013

MARGIS, Regina et al. Relação entre estressores, estresse e ansiedade. **Revista de Psiquiatria do Rio Grande do Sul**, v. 25, n. 1, p. 65-74, 2003.

NEMEROFF, Charles B.; VALE, Wylie W. The neurobiology of depression: inroads to treatment and new drug discovery. **The Journal of clinical psychiatry**, v. 66, p. 5-13, 2005.

NEMEROFF, C. B. The corticotropin-releasing factor (CRF) hypothesis of depression: new findings and new directions. **Mol Psychiatry**, v. 1, n. 4, p. 336-342, 1996.

NEMEROFF, Charles B. et al. Elevated concentrations of CSF corticotropin-releasing factor-like immunoreactivity in depressed patients. **Science**, v. 226, n. 4680, p. 1342-1344, 1984.

NESTLER, Eric J. et al. Neurobiology of depression. **Neuron**, v. 34, n. 1, p. 13-25, 2002.

GOLD, Phillip W.; MACHADO-VIEIRA, Rodrigo; PAVLATOU, Maria G. Clinical and biochemical manifestations of depression: relation to the neurobiology of stress. **Neural plasticity**, 2015.

GONG, Shuangjun et al. Inhibitory effect of bionic fungicide 2-allylphenol on *Botrytis cinerea* (Pers. ex Fr.) in vitro. **Pest management science**, v. 65, n. 12, p. 1337-1343, 2009.

HARRIS, Ruth BS. Chronic and acute effects of stress on energy balance: are there appropriate animal models?. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 308, n. 4, p. R250-R265, 2014.

HARZHEIM, ERNO; AGOSTINHO, MILENA RODRIGUES; KATZ, NATAN (Org.). Protocolos de encaminhamento para psiquiatria adulto [Internet]. Porto Alegre: Secretaria Estadual da Saúde do Rio Grande do Sul; TelessaúdeRS-UFRGS, 2016. Disponível em: . Acesso em: 17 abr. 2017.

HIDAKA, B.H. Depression as a disease of modernity: explanations for increasing prevalence. **Journal of affective disorders**, v. 140, n. 3, p. 205-214, 2012.

HORWITZ, Allan V.; WAKEFIELD, Jerome C.; LORENZO-LUACES, Lorenzo. History of depression. **The Oxford handbook of mood disorders**, p. 11-23, 2016.

ISHIKAWA, Yuka et al. Rapid and sustained antidepressant effects of resolin D1 and D2 in a chronic unpredictable stress model. **Behavioural brain research**, v. 332, p. 233-236, 2017.

JUSTER, Robert-Paul; MCEWEN, Bruce S.; LUPIEN, Sonia J. Allostatic load biomarkers of chronic stress and impact on health and cognition. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 35, n. 1, p. 2-16, 2010.

KALUEFF, Allan V. et al. Neurobiology of rodent self-grooming and its value for translational neuroscience. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 17, n. 1, p. 45, 2016.

KATZ, Richard J. Animal model of depression: pharmacological sensitivity of a hedonic deficit. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 16, n. 6, p. 965-968, 1982.

KELLAR, Kenneth J.; STOCKMEIER, Craig A. Effects of Electroconvulsive Shock and Serotonin Axon Lesions on Beta-Adrenergic and Serotonin-2 Receptors in Rat Brain. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 462, n. 1, p. 76-90, 1986.

KRISHNAN, Shanmuga Sundaram Chinna; SUBRAMANIAN, Iyyam Pillai; SUBRAMANIAN, Sorimuthu Pillai. Isolation, characterization of syringin, phenylpropanoid glycoside from *Musa paradisiaca* tepal extract and evaluation of its antidiabetic effect in streptozotocin-induced diabetic rats. **Biomedicine & Preventive Nutrition**, v. 4, n. 2, p. 105-111, 2014.

LEE, Ji Yun et al. Anti-asthmatic effects of phenylpropanoid glycosides from *Clerodendron trichotomum* leaves and *Rumex gmelini* herbes in conscious guinea-

pigs challenged with aerosolized ovalbumin. **Phytomedicine**, v. 18, n. 2-3, p. 134-142, 2011.

LEHTINEN, Ville; JOUKAMAA, Matti. Epidemiology of depression: prevalence, risk factors and treatment situation. **Acta Psychiatrica Scandinavica**, v. 89, n. s377, p. 7-10, 1994.

LIPINSKI, Robert J. et al. Dose-and route-dependent teratogenicity, toxicity, and pharmacokinetic profiles of the hedgehog signaling antagonist cyclopamine in the mouse. **Toxicological sciences**, v. 104, n. 1, p. 189-197, 2008.

MANNAN, Abdul; ABIR, Ariful Basher; RAHMAN, Rashidur. Antidepressant-like effects of methanolic extract of *Bacopa monniera* in mice. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 15, n. 1, p. 337, 2015.

MARIN, Ioana A. et al. Microbiota alteration is associated with the development of stress-induced despair behavior. **Scientific reports**, v. 7, p. 43859, 2017.

MILLER, Andrew H.; MALETIC, Vladimir; RAISON, Charles L. Inflammation and its discontents: the role of cytokines in the pathophysiology of major depression. **Biological psychiatry**, v. 65, n. 9, p. 732-741, 2009.

MORENO, Ricardo Alberto; MORENO, Doris Hupfeld; SOARES, Márcia Britto de Macedo. Psicofarmacologia de antidepressivos. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 21, p. 24-40, 1999.

MOTA-PEREIRA, Jorge et al. Moderate exercise improves depression parameters in treatment-resistant patients with major depressive disorder. **Journal of psychiatric research**, v. 45, n. 8, p. 1005-1011, 2011.

MUTLU, Oguz et al. Effects of fluoxetine, tianeptine and olanzapine on unpredictable chronic mild stress-induced depression-like behavior in mice. **Life sciences**, v. 91, n. 25-26, p. 1252-1262, 2012.

NADAL-VICENS, Mireya; CHYUNG, Jay H.; TURNER, Timothy J. Farmacologia da neurotransmissão serotoninérgica e adrenérgica central. **ARMSTRONG, EJ; GOLAN, DE; ARMEN, H. Princípios de Farmacologia: A Base Fisiopatológica da Farmacoterapia**, v. 2, p. 186-202, 2009.

NEIS, Vivian B. et al. Acute agmatine administration, similar to ketamine, reverses depressive-like behavior induced by chronic unpredictable stress in mice. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 150, p. 108-114, 2016.

NESTLER, Eric J. et al. Neurobiology of depression. **Neuron**, v. 34, n. 1, p. 13-25, 2002.

O'LEARY, Olivia F.; DINAN, Timothy G.; CRYAN, John F. Faster, better, stronger: towards new antidepressant therapeutic strategies. **European journal of pharmacology**, v. 753, p. 32-50, 2015.

OLIVEIRA, Henrique Souza Barros de; FUMIS, Renata Rego Lins. Sex and spouse conditions influence symptoms of anxiety, depression, and posttraumatic stress disorder in both patients admitted to intensive care units and their spouses. **Rev. bras. ter. intensiva**, São Paulo , v. 30, n. 1, p. 35-41, Mar. 2018 .

OSANLOO, N. et al. Papaver rhoeas L. hydroalcoholic extract exacerbates forced swimming test-induced depression in mice. **Basic and clinical neuroscience**, v. 7, n. 3, p. 195, 2016.

PAULUS, Martin P.; GEYER, Mark A. Three independent factors characterize spontaneous rat motor activity. **Behavioural Brain Research**, v. 53, n. 1-2, p. 11-20, 1993

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

PECHLIVANOVA, D. et al. Dose-dependent effects of caffeine on behavior and thermoregulation in a chronic unpredictable stress model of depression in rats. **Behavioural brain research**, v. 209, n. 2, p. 205-211, 2010

POTTENGER, Lynn H. et al. The relative bioavailability and metabolism of bisphenol A in rats is dependent upon the route of administration. **Toxicological Sciences**, v. 54, n. 1, p. 3-18, 2000.

QU, Tianli et al. Metabolism of fungicide 2-allylphenol in *Rhizoctonia cerealis*. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 102, p. 136-141, 2014.

RAMOS, Gizele Carmem Fagundes et al. Prevalência de sintomas depressivos e fatores associados em idosos no norte de Minas Gerais; um estudo de base populacional. **Jornal Brasileiro de Psiquiatria**, v. 64, n. 2, p. 122-131, 2015.

RAZZOLI, Maria; BARTOLOMUCCI, Alessandro. The dichotomous effect of chronic stress on obesity. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 27, n. 7, p. 504-515, 2016.

REICH, Christian G.; TAYLOR, Michael E.; MCCARTHY, Margaret M. Differential effects of chronic unpredictable stress on hippocampal CB1 receptors in male and female rats. **Behavioural brain research**, v. 203, n. 2, p. 264-269, 2009.

RICHELSON, Elliott. Pharmacology of antidepressants. In: **Mayo Clinic Proceedings**. Elsevier, 2001. p. 511-527.

ROWLAND, Neil E.; ANTELMAN, Seymour M. Stress-induced hyperphagia and obesity in rats: a possible model for understanding human obesity. **Science**, v. 191, n. 4224, p. 310-312, 1976.

SELYE, Hans. The Evolution of the Stress Concept: The originator of the concept traces its development from the discovery in 1936 of the alarm reaction to modern therapeutic applications of syntoxic and catatonic hormones. **American scientist**, v. 61, n. 6, p. 692-699, 1973.

SCHILDKRAUT, Joseph J. The catecholamine hypothesis of affective disorders: a review of supporting evidence. **American journal of Psychiatry**, v. 122, n. 5, p. 509-522, 1965.

SOUZA, Ana Cláudia de; ALEXANDRE, Neusa Maria Costa; GUIRARDELLO, Edinêis de Brito. Propriedades psicométricas na avaliação de instrumentos: avaliação da confiabilidade e da validade. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 26, p. 649-659, 2017.

STANDAERT, D. G.; GALANTER, J. M. Farmacologia da Neurotransmissão Dopaminérgica. In: GOLAN, David E. **Princípios de farmacologia: a base fisiopatológica da farmacoterapia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009.

STANFORD, S. Clare. The Open Field Test: reinventing the wheel. 2007

STOPA, Sheila Rizzato et al. Prevalência do autorrelato de depressão no Brasil: resultados da Pesquisa Nacional de Saúde, 2013. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 18, n. suppl 2, p. 170-180, 2015.

SULLIVAN, Patrick F.; NEALE, Michael C.; KENDLER, Kenneth S. Genetic epidemiology of major depression: review and meta-analysis. **American Journal of Psychiatry**, v. 157, n. 10, p. 1552-1562, 2000.

TAYLOR, Chirisse et al. Mechanisms of action of antidepressants: from neurotransmitter systems to signaling pathways. **Cellular signalling**, v. 17, n. 5, p. 549-557, 2005.

VIJAYARAGHAVAN, R. et al. Differential toxicity of sulfur mustard administered through percutaneous, subcutaneous, and oral routes. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 202, n. 2, p. 180-188, 2005.

VOLPI-ABADIE, Jacqueline; KAYE, Adam M.; KAYE, Alan David. Serotonin syndrome. **The Ochsner Journal**, v. 13, n. 4, p. 533-540, 2013.

WAGNER, Stefanie et al. Early improvement as a resilience signal predicting later remission to antidepressant treatment in patients with Major Depressive Disorder: Systematic review and meta-analysis. **Journal of psychiatric research**, v. 94, p. 96-106, 2017.

WHITTIER, Anjalene B. et al. Major depressive disorder and suicidal behavior among urban dwelling Ethiopian adult outpatients at a general hospital. **Journal of affective disorders**, v. 197, p. 58-65, 2016.

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

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global and regional estimates of prevalence – depression. In: LEFSTAD, ERICA. **Depression and other common mental disorders: global health estimates**. Suíça: World Health Organization, 2017.

XIA, Yuanyuan et al. Development of a monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay for the analysis of the new fungicide 2-allylphenol in strawberry fruits. **Food chemistry**, v. 120, n. 4, p. 1178-1184, 2010.

YAMADA, Chihiro; MOGAMI, Sachiko; HATTORI, Tomohisa. Psychological stress exposure to aged mice causes abnormal feeding patterns with changes in the bout number. **Aging (Albany NY)**, v. 9, n. 11, p. 2269, 2017.

YAN, Jingyi et al. Chronic unpredictable stress abrogates the endotoxin tolerance induced by repeated peripheral LPS challenge via the TLR4 signaling pathway. **Neuroscience letters**, v. 645, p. 7-13, 2017.

YOHN, Christine N.; GERGUES, Mark M.; SAMUELS, Benjamin Adam. The role of 5-HT receptors in depression. **Molecular brain**, v. 10, n. 1, p. 28, 2017.

ZHANG, L. Primary study of the control mechanism of 2-allylphenol and 4-butanoyl phenol on wheat Rhizoctonia root rot. **Master's Thesis**, 2003.

ZHOU, Xinyu et al. Comparative efficacy and acceptability of antidepressants, psychological interventions, and their combination for depressive disorder in children and adolescents: protocol for a network meta-analysis. **BMJ open**, v. 7, n. 8, p. e016608, 2017.

ANEXO

Anexo A – Certidão de aprovação do projeto junto à Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA).



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)



CERTIFICADO (2ª VIA)

Certificamos que o projeto intitulado "Estudo pré-clínicos de substâncias isoladas de óleos essenciais no sistema nervoso central", protocolo nº 046/2016 sob a responsabilidade da pesquisadora Dra. Miriam Graciele da Silva Stiebbe Salvadori – que envolve a produção, manutenção e/ou a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal da Paraíba (CEUA-UFPB).

Vigência do Projeto	2016 – 2018
Espécie/linhagem	<i>Mus musculus</i> - Swiss
Número de animais	352
Idade/Peso	25-35 g / 2-3 meses
Sexo	Machos
Origem	Biotério Prof. Thomas George

Prof. Dr. Ricardo Romão Guerra
CEUA-UFPB

Anexo B – Formulário para Triagem Farmacológica Comportamental

PROTOCOLO DA TRIAGEM FARMACOLÓGICA COMPORTAMENTAL

PRODUTO: _____ DOSE: _____

DATA: ____/____/____

VIA DE ADMINISTRAÇÃO DO TRATAMENTO: _____

ANIMAL/SEXO/IDADE: _____

RESPONSÁVEL PELO EXPERIMENTO: _____

ATIVIDADE FARMACOLÓGICA	Quantificação dos efeitos (0) sem efeito, (-) efeito diminuído, (+) efeito presente, (++) efeito intenso				
	até 30´	60´	120´	180´	240´
1 – SNC					
a – Estimulante					
Hiperatividade					
Irritabilidade					
Agressividade					
Tremores					
Convulsões					
Piloereção					
Movimento intenso das vibrissas					
Outras _____					
b – Depressora					
Hipnose					
Ptose					
Sedação					
Anestesia					
Ataxia					
Reflexo do endireitamento					
Catatonía					
Analgesia					
Resposta ao toque diminuído					
Perda do reflexo corneal					
Perda do reflexo auricular					
c - Outros comportamentos					
Ambulação					
Bocejo excessivo					
Grooming					
Rearing					
Escalar					
Vocalizar					
Sacudir a cabeça					
Contorções abdominais					
Abdução das patas do trem					

posterior					
Pedalar					
Estereotipia					
2 - SN AUTÔNOMO					
Diarréia					
Constipação					
Defecação aumentada					
Respiração forçada					
Lacrimejamento					
Micção					
Salivação					
Cianose					
Tono muscular					
Força para agarrar					
3 - MORTE					

obs.:

Glossário

Adrenocorticotropina: Polipeptídeo com trinta e nove aminoácidos produzido pelas células corticotróficas da adeno-hipófise.

Anedonia: Perda da capacidade de sentir qualquer prazer em tempo integral.

Anorgasmia: Inibição recorrente ou persistente do orgasmo.

Artralgia: Dor articular.

Antinocicepção: Capacidade de se perceber o estímulo da dor.

Bioativo: Propriedade inerente de alguns compostos de gerar um efeito sobre um organismo, por atuarem em vias metabólicas.

Citocinas: Termo que se refere a uma gama de polipeptídeos ou glicoproteína produzidos por diversos tipos celulares e que possuem capacidade de modular a resposta celular no desencadeamento de respostas imunes.

Corticosterona: Hormônio da classe dos glicocorticoides. Seria o equivalente ao cortisol em roedores.

Eosinofilia: Aumento da concentração de eosinófilos no sangue.

Epigenético: Modificações do genoma que são herdadas pelas próximas gerações, mas que não alteram as informações nas fitas de DNA.

Hiperfagia: Ingestão de grande quantidade de alimento.

Hipervigilância: Estado de tensão e alerta aumentados que acompanham um comportamento de prevenção do perigo.

Inflamassoma: Complexo proteico que compreende um sensor intracelular, tipicamente um receptor Nod-like, o precursor procaspase-1 e o adaptador ASC, ou também chamado PYCARD (proteínas speck-like associada à apoptose com domínio de recrutamento de caspases).

Maravalha: Aparas de madeira, com trigonometria controlada, formato mais homogêneos e que apresenta maior maciez, maiores que a serragem, em tamanho e espessura produzida por máquinas especializadas.

Monoamina: Substâncias bioquímicas oriundas do processo de descarboxilação de aminiácidos.

Nocicepção: Mecanismo pelo qual os estímulos periféricos são transmitidos ao SNC, ou seja, significa a percepção dos estímulos nocivos.

Piloereção: Ereção/levantamento do pelo.