



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E FARMACOLOGIA



RAFAEL MORAES AGUIAR

**AVALIAÇÃO DO EFEITO NEUROPROTETOR DO ÁCIDO  
ROSMARÍNICO EM UM MODELO PRÉ-CLÍNICO DE TRANSTORNO  
DE ESTRESSE PÓS-TRAUMÁTICO EM CAMUNDONGOS**

VITÓRIA

2019

RAFAEL MORAES AGUIAR

**AVALIAÇÃO DO EFEITO NEUROPROTETOR DO ÁCIDO  
ROSMARÍNICO EM UM MODELO PRÉ-CLÍNICO DE TRANSTORNO  
DE ESTRESSE PÓS-TRAUMÁTICO EM CAMUNDONGOS**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Farmacologia da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Bioquímica e Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Adair Roberto Soares dos Santos.

Coorientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup>. Cristina Martins e Silva.

VITÓRIA

2019

A282a Aguiar, Rafael Moraes, 1986-  
Avaliação do efeito neuroprotetor do ácido rosmarínico em  
um modelo pré-clínico de transtorno de estresse pós-traumático  
em camundongos / Rafael Moraes Aguiar. - 2019.  
110 f. : il.

Orientador: Adair Roberto Soares dos Santos.

Coorientadora: Cristina Martins-Silva.

Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Farmacologia) -  
Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da  
Saúde.

1. transtorno de estresse pós-traumático. 2. ácido  
rosmarínico. 3. comportamento. 4. eixo hipotalâmico-hipofise  
adrenal. 5. esquivia inibitória. 6. fatores neurotróficos. I. dos  
Santos, Adair Roberto Soares. II. Martins-Silva, Cristina. III.  
Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências da  
Saúde. IV. Título.

CDU: 61

---

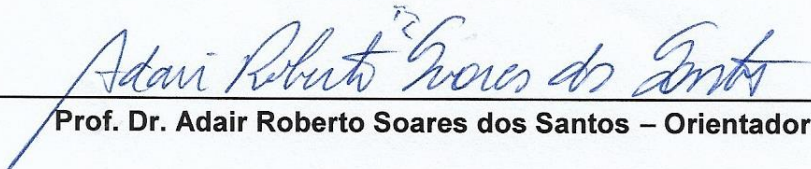
Rafael Moraes Aguiar


**“Avaliação do efeito neuroprotetor do ácido rosmarínico em um modelo pré-clínico de transtorno de estresse pós-traumático em camundongos”**


Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Farmacologia da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Farmacologia.

Aprovado(a) em 08 de maio de 2019.

**BANCA EXAMINADORA:**

  
Prof. Dr. Adair Roberto Soares dos Santos – Orientador

  
Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Cristina Martins e Silva – Coorientadora

  
Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Fabiana Vasconcelos Campos – Examinador Interno

  
Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Livia Carla de Melo Rodrigues – Examinador Externo

Vitória/ES  
2019

Esse trabalho foi realizado no Laboratório de Neurobiologia Molecular e Comportamental (LNMC) situado no Departamento de Fisiologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES) e no Laboratório de Neurobiologia da Dor e Inflamação (LANDI) situado no Departamento de Ciências Fisiológicas pertencente ao Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) com auxílio financeiro das seguintes instituições:

- Conselho Nacional do Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq);
- Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Ensino Superior (CAPES);
- Fundação de Amparo à Pesquisa do Espírito Santo (FAPES).

Dedico essa dissertação a todas as pessoas que sofrem ou já sofreram de distúrbios psiquiátricos, bem como aquelas que perderam seus entes na luta contra tais doenças, em especial às diagnosticadas com transtorno de estresse pós-traumático.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, minha fortaleza, por cuidar de mim e permitir que tenha saúde e fé para encarar todos esses sonhos que tenho sonhado junto a Ele, tornando possível que esses projetos se tornem realidade em vida minha e também de alguma forma poder retribuir para a sociedade, mesmo que sutilmente, para a elucidação e desenvolvimento de novas abordagens dentro dos transtornos psiquiátricos.

Aos meus pais, Vani e Paulo, pelo amor e apoio incondicional durante toda jornada de vida, principalmente durante o mestrado, período no qual me deram todo o suporte necessário para focar nos estudos e pesquisas, onde passei por diversas mudanças intensas, deixando para trás certa estabilidade profissional que já possuía, fato este que poderia ter sido determinante na concretização dessa jornada. Se não fosse o suporte que me deram com certeza nada disso seria possível. Vocês são meu porto seguro.

Ao meu irmão Thalles pelo amor, incentivo e exemplo próximo que sempre me propulsionaram a continuar me capacitando profissionalmente.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Adair Roberto Soares dos Santos, por me apresentar a linha de pesquisa de doenças psiquiátricas e acreditar no meu potencial, apontando dicas de como me aperfeiçoar como professor e pesquisador dentro das ciências básicas e de neurociências durante o período de colaboração que passei dentro de seu laboratório na Universidade Federal de Santa Catarina. Foram experiências que jamais me esquecerei como pessoa e profissional.

A minha coorientadora, Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Cristina Martins e Silva, por me aceitar em seu laboratório por praticamente todo o período do curso e por entrar de cabeça junto comigo na pesquisa, além de compartilhar todo seu imenso conhecimento e ir para a bancada quando necessário, além das cobranças quando necessário e exigir resultados robustos em que pudesse responder às diversas questões. Sou imensamente grato e a admiro integralmente, fui abençoado por ter sido agraciado por praticamente dois orientadores.

A Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Rita Gomes Wanderley Pires por contribuir inúmeras vezes com o meu desenvolvimento durante as reuniões semanais de laboratório discutindo artigos científicos, incentivar na participação de disciplina e cursos na UFMG, pela aquisição do padrão de corticosterona para as análises por HPLC-UV/VIS, por apontar caminhos desde o início do

mestrado e a participar do meu exame de qualificação, atitudes que foram cruciais na minha jornada ao longo do mestrado.

Ao Prof. Dr. Luiz Carlos Schenberg por gentilmente ceder seu Laboratório de Neurobiologia dos Transtornos de Humor e Ansiedade (LANTHA) e sua sala de experimentação comportamental, fundamentais para o desenvolvimento desse trabalho.

A Prof. Dr.<sup>a</sup> Livia Carla de Melo Rodrigues por aceitar participar do meu exame de qualificação e por ceder gentilmente reagentes para as dosagens no HPLC-UV/Vis, contribuindo de sobremaneira com o trabalho desenvolvido.

Aos colegas do Laboratório de Neurobiologia Molecular e Comportamental (LNMC), Alessandra Job, Alice Herlinger, Emanuel Dalmaso, Lara Vezula, Lorena Areal, Glenda Ferreira, Matheus Vaz, Natalie Pinho, Sarah Presti-Silva, Suellen Mendonça, Tamara Alarcon, Thiago Menezes, todos foram elementos-chave para o meu desenvolvimento humano e científico.

Aos colegas do LANDI, Jhenifer Karvat, Larissa Beppler, Carol Cunha, Fernando, Scheila Kraus e Thayza pela companhia e paciência em me acomodar durante meus experimentos no laboratório e em especial a Tassiane Andrade e Gleicilaine Sena Casseb por me receberem em Florianópolis - SC, e me conduzirem tanto dentro quanto fora da UFSC.

Aos colegas Murilo Luiz Cerutti e Thais Ferreira de Barros por compartilharem todo o *know-how* desenvolvido e permitir de tal forma que eu continuasse a honrosa missão de aprofundar as pesquisas sobre transtorno de estresse pós-traumático.

Em especial, aos animais de laboratório que diariamente doam suas vidas em prol do desenvolvimento de novas técnicas de prevenção, tratamento e/ou controle de uma série de patologias que assolam o planeta, tonando viável a observação *in vivo* em sistemas biológicos com extraordinária ciência translacional ao organismo humano.

Ao Laboratório Multiusuário de Análises Biomoleculares (LABIOM) do Centro de Ciências da Saúde da UFES e à equipe técnica, Prof. Dr. Alexandre Martins Costa Santos, Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Juliana Barbosa Coitinho Gonçalves, M.Sc. Evaldo Vitor Pereira e as técnicas M.Sc. Caroline Maia e M.Sc. Natércia Alves pela contribuição com as análises bioquímicas no HPLC-UV/Vis e HPLC-ECD.



Aos colegas do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Farmacologia (UFES), Ana Maria Rodrigues, Bruno Magela, Dayanne Pinho, Diandra Zipinotti, Fabiano Torres, Glenda Ferreira, Kamila Crico, Lara Damasceno, Luis Contreras, Marcelly Lorentz, Pedro Malacarne, Rafaela Fernandes, Randriely Merscher, Sarah Presti e Suellem Mendonça durante o período das disciplinas, organizações de cursos de férias, congressos, enfim foram grandes momentos de partilha e aprendizado tanto dentro quanto fora da Universidade que ficarão registrados para sempre.

Aos amigos Arlete Sipolatti, Augusto Ramallete, Carlos Gonçalves, Cleber Rangel, Daniel Trindade, Emanuelle Jahel, Etevaldo Batista, George Gasperin, Getúlio Tavares, Hebert Souza, Juliana Silveira, Josué de Sá, Luana Trassi, Mateus Fantecelle, Paula Dutra, Reinaldo Stutz, Ygor Ribeiro, Yolanda Cavalcanti, pelo exemplo, incentivo e apoio que sempre me deram nas tomadas de decisão.

Ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Farmacologia (UFES) e aos professores que contribuíram nessa honrosa missão de compartilhar o conhecimento, bem como das secretárias Kelly e Damiana pela disponibilidade em resolver as questões burocráticas no dia-a-dia da pós-graduação.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (UFES) e Programa de Ciências Fisiológicas (UFES), bem como aos professores que disponibilizaram vagas em suas disciplinas para que eu pudesse complementar minha formação acadêmica.

Ao Programa de Apoio à Pós-Graduação (PROAP) pela ajuda de custo concedida para realização de experimentos na UFSC e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida durante parte do mestrado.

A todos os funcionários do Centro de Ciências da Saúde (UFES) dos setores de secretaria, CEUA, protocolo, limpeza, segurança e subprefeitura que de alguma forma foram determinantes por impactar uma rotina de convivência saudável nesses últimos anos.

A todos que me deram suporte e mesmo aqueles que não me apoiaram e criticaram, vocês foram determinantes para que eu chegasse ao fim desse trabalho. Minha eterna gratidão!

"Sabemos que todas as coisas cooperam para o bem daqueles que amam a Deus, daqueles que são chamados segundo o seu propósito".

(Romanos 8, 28)

Paulo Apóstolo

## RESUMO

**Introdução:** O transtorno de estresse pós-traumático (TEPT) é um distúrbio psiquiátrico incapacitante desencadeado após exposição a eventos traumáticos como guerras, acidentes, agressões, sequestros, violência sexual e/ou física entre outros. Esse distúrbio gera várias alterações orgânicas, dentre elas a desregulação do eixo hipotalâmico-hipofisário-adrenal (HHA) que está associado a alterações na secreção de cortisol e neurodegeneração em regiões como amígdala, hipocampo e córtex pré-frontal (CPF). Embora a maioria dos pacientes se recupere desta desordem por meio de psicoterapia e/ou farmacoterapia, grande parte dos pacientes apresentam recidivas, resistência ou resposta refratária ao tratamento. Dentre as terapias, o uso de plantas medicinais e/ou de seus derivados tem-se mostrado efetivo no tratamento de diversas doenças do sistema nervoso central. Neste contexto, o ácido rosmarínico (AR) emerge como potencial terapêutico devido a seus efeitos antioxidantes, neuroprotetores e antidepressivos já descritos cientificamente.

**Objetivo:** no presente estudo, testamos se o tratamento oral com o AR atenua ou mesmo previne os sintomas emocionais e alterações bioquímicas presentes no modelo pré-clínico de TEPT. **Material e métodos:** Camundongos Swiss machos e fêmeas foram submetidos a um modelo de TEPT por meio de um choque inescapável nas patas. Avaliação da atividade locomotora, emocional (medo, ansiedade) e de aprendizado e memória foram realizadas. Além disto, foi quantificada a concentração de corticosterona no plasma. Também foram quantificados os níveis protéicos do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) e do fator neurotrófico derivado da glia (GDNF) no hipocampo através de imunoblot.

**Resultados e conclusão:** A análise comportamental do tempo de congelamento ou *freezing* mostrou um resultado de formato em U no paradigma de curva dose-resposta dos animais tratados com o AR, apontando a dose de 30 mg/kg como a mais eficiente em prevenir o comportamento de *freezing* [ $F_{(5, 78)} = 18,36$ ;  $p \leq 0,0001$ ], considerado o aspecto comportamental mais palpável na análise etológica em modelos pré-clínicos de trauma. O tratamento com o AR na dose de 30 mg/kg também manteve os níveis de corticosterona 24h após o evento traumático mantendo em níveis semelhantes ao dos animais controle, sugerindo um efeito protetor sobre o eixo HHA. No teste de esquiva inibitória a resposta dos animais apontou que não há ação negativa ou inespecífica do AR 30 mg/kg sobre a memória

ou aprendizagem [ $F_{(1, 31)} = 167,1; p \leq 0,0001$ ]. Adicionalmente, o tratamento com o AR 30 mg/kg tendeu manter a expressão protéica de BDNF e GDNF semelhante aos animais controle. Em conclusão, nós sugerimos que o tratamento com AR na dose 30mg/kg possa ser uma potencial droga para aliviar sintomas comportamentais debilitantes, além de regular algumas das alterações bioquímicas desencadeadas pelo TEPT.

**Palavras chaves:** Transtorno de estresse pós-traumático (TEPT), ácido rosmarínico (AR), eixo hipotalâmico-hipofisário-adrenal (HHA), esquiva inibitória (EI), fatores neurotróficos, neuroinflamação.

## ABSTRACT

**Introduction:** Post-traumatic stress disorder (PTSD) is one of the most prevalent and disabling psychiatric disorders developed by exposure to traumatic events such as wars, accidents, assaults, kidnappers, violations, assaults, abductions, traffic accidents, fires, wars, sexual and/or physical violence among others. Although most patients recover from this disorder, through psychotherapy and/or pharmacotherapy, most patients experience relapses, resistance or response refractory to treatment, in addition to deregulation of the hypothalamic-pituitary adrenal (HPA) axis associated with alterations in cortisol secretion and prognosis of severe neuronal degeneration in amygdala hippocampus and prefrontal cortex. Among the alternative therapies, the use of medicinal plants or their derivatives had shown to be highly attractive for the treatment of several neuropathologies. In this context, rosmarinic acid (RA) treatment has previously exhibited antioxidant, neuroprotective, and antidepressant-like effects. RA is a polyphenol derived from caffeic acid and 3,4-dihydroxyphenylacetic acid found in several plants, mainly in Rosemary (*Rosmarinus officinalis*). **Objective:** In the present study, we tested whether RA has a therapeutic potential to alleviate the symptoms and biochemical alterations in a pre-clinical murine model of PTSD. **Material and methods:** Male Swiss mice were traumatic to a PTSD induction model through a strategy of inescapable foot shock (ISF). Behavioral evaluation at the level of locomotor activity and emotional evaluation in a dose-response curve paradigm was also performed. Influences on learning and memory were evaluated through the inhibitory avoidance test. The expressed amounts of the proteins neurotrophic factors derived from the brain (BDNF) and from the glial cells (GDNF) via Western Blot were taken. **Results and conclusion:** The behavioral analysis showed a U-shaped result in the dose-response curve paradigm of the animals treated with RA, pointing the dose of 30 mg/kg as the most efficient in reversing the freezing behavior ( $F_{(5, 78)} = 18.36$ ,  $p \leq 0.0001$ ), considered the main behavior in the etological analysis of trauma models. The dose of AR 30 mg/kg also maintained the levels of corticosterone 24h after the traumatic event [ $F_{(3, 22)} = 5.93$ ,  $p = 0.0040$ ], maintaining at levels similar to that of healthy animals up to 48h after the traumatic event [ $F_{(3, 24)} = 5.235$ ,  $p = 0.0064$ ], suggesting a protective effect of RA over the HPA axis. The inhibitory avoidance test showed no negative or nonspecific action on memory or learning in the treatment with RA at a dose of 30 mg/kg [ $F_{(1, 31)} = 167.1$ ,  $p \leq 0.0001$ ]. The AR 30

mg/kg, despite the non-statistical difference, maintained the tendency to regulate the expression profile of BDNF and GDNF at the level of healthy animals. Through these results, it is possible to assign RA as an alternative and safe tool for the treatment and development of PTSD. In conclusion, we strongly suggest that the treatment with RA in the 30mg/kg dose regimen may be a potential drug to relieve debilitating behavioral symptoms and to regulate the expressive biochemical alterations triggered in PTSD patients.

**Palavras chaves:** Posttraumatic stress disorder (PTSD), rosmarinic acid (RA), hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis, inhibitory avoidance (IA), neurotrophic factors, neuroinflammation.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Cascata de liberação de hormônios em consequência da estimulação do hipotálamo pelo sistema nervoso central.....	25
Figura 2 -	Estruturas-chave na circuitaria envolvida na regulação emocional.....	27
Figura 3 -	Desregulação no eixo hipotalâmico-hipofisário-adrenal envolvido no TEPT.....	28
Figura 4 -	Síntese e degradação do sistema serotoninérgico.....	32
Figura 5 -	Neurotransmissão serotoninérgica.....	33
Figura 6 -	Espécies de plantas que contém o Ácido Rosmarínico.....	38
Figura 7 -	Fórmula molecular do Ácido Rosmarínico.....	39
Figura 8 -	Delineamento experimental.....	46
Figura 9 -	Aparato <i>step down</i> modificado para camundongos.....	48
Figura 10 -	Labirinto em cruz elevado para camundongos.....	49
Figura 11 -	Efeito dose dependente do AR no comportamento de camundongos machos submetidos ao modelo de TEPT.....	57
Figura 12 -	Efeito dose dependente da sertralina no comportamento de camundongos machos submetidos ao modelo de TEPT.....	58
Figura 13 -	Efeito dose dependente do AR no comportamento de camundongos fêmeas submetidas ao modelo de TEPT.....	60
Figura 14 -	Efeito dose dependente da sertralina no comportamento de camundongos fêmeas submetidas ao modelo de TEPT.....	61
Figura 15 -	Efeito ansiolítico do AR no LCE durante evocação da memória aversiva do TEPT.....	63

Figura 16 - Efeito do AR e da sertralina sobre a memória aversiva.....	64
Figura 17 - Dosagem corticosterona no plasma sanguíneo.....	65
Figura 18 - Expressão de fatores neurotróficos BDNF e GDNF no hipocampo.....	66
Figura S. 1 - Delineamento experimental (experimento piloto).....	93
Figura S. 2 -Atividade locomotora 24h após indução do TEPT animal.....	94
Figura S. 3 -Atividade comportamental 24h após indução do TEPT animal.....	95
Figura S. 4 - Avaliação da extinção da atividade locomotora no modelo de TEPT.....	97
Figura S. 5 - Avaliação da extinção comportamental no modelo de TEPT.....	98



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Receptores serotoninérgicos de interesse farmacológico.....	33
Tabela 2 - Outras espécies de plantas que contém o AR.....	37
Tabela 3 - Resumo de efeitos dos tratamentos com AR e sertralina nos camundongos submetidos ao TEPT.....	61

## LISTA DE SIGLAS

<b>ANOVA</b>	Análise de variância
<b>ACTH</b>	Hormônio adrenocorticotrófico (do inglês <i>adrenocorticotropic hormone</i> )
<b>APA</b>	American Psychiatric Association
<b>AR</b>	Ácido rosmarínico
<b>BDNF</b>	Fator neurotrófico derivado do cérebro
<b>BHE</b>	Barreira hematoencefálica
<b>CCA</b>	Córtex cingulado anterior
<b>CEUA</b>	Comissão de Ética no Uso de Animais
<b>CID-10</b>	Classificação Estatística Internacional de Doenças e Problemas Relacionados com a Saúde (do inglês <i>International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems, ICD</i> )
<b>CPF</b>	Córtex pré-frontal
<b>CPFm</b>	Córtex pré-frontal medial
<b>CPFvm</b>	Córtex pré-frontal ventromedial
<b>CRH</b>	Hormônio liberador de corticotrofina (do inglês <i>corticotropin releasing hormone</i> )
<b>DCNT</b>	Doenças crônicas não transmissíveis
<b>DMSO</b>	Dimetilssulfóxido
<b>DSM</b>	Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais
<b>EPM</b>	Erro padrão da média
<b>ERK 1/2</b>	Cinase reguladora extracelular (do inglês <i>extracellular signal-regulated kinases</i> )
<b>FDA</b>	Agência Americana de Administração de Alimentos e Medicamentos (do inglês <i>Food and Drug Administration</i> )
<b>FPS</b>	Quadros por segundo (do inglês <i>frames per second</i> )
<b>GDNF</b>	Fator neurotrófico derivado da glia
<b>GR</b>	Receptor glicocorticóide (do inglês <i>glucocorticoid receptor</i> )
<b>GSH</b>	Glutathiona reduzida
<b>HPLC</b>	Cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês <i>high performance liquid chromatography</i> )
<b>IMAO</b>	Inibidores da monoamina oxidase

<b>i.g.</b>	Intragástrico
<b>i.p.</b>	Intraperitoneal
<b>ISRS</b>	Inibidores seletivos da recaptação de serotonina
<b>ISRN</b>	Inibidores seletivos da recaptação de noradrenalina
<b>MAP-1</b>	Modulador de apoptose-1 (do inglês <i>modulator of apoptosis-1</i> )
<b>MAPK</b>	Proteína cinase ativada por mitógeno
<b>MDA</b>	Malondialdeído
<b>NADPH</b>	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato ou fosfato dedinucleotídeo de adenina e nicotinamida
<b>NOX</b>	NADPH oxidase
<b>NOX2</b>	Subunidade de membrana catalítica gp91phox
<b>TCA</b>	Antidepressivos tricíclicos
<b>TCC</b>	Terapia cognitivo comportamental
<b>TE</b>	Tronco encefálico
<b>TPH</b>	Triptofano hidroxilase
<b>5-HT</b>	Serotonina ou 5-hidroxitriptamina
<b>5-HIAA</b>	Ácido 5 hidroxindolacético
<b>s.c.</b>	Subcutâneo
<b>SI</b>	Sistema imunológico
<b>SNC</b>	Sistema Nervoso Central
<b>GABA</b>	Ácido gamaminobutírico
<b>PCR</b>	Reação em cadeia da polimerase (do inglês <i>Polymerase Chain Reaction</i> )
<b>RM</b>	Ressonância magnética
<b>ROS</b>	Espécies reativas de oxigênio (do inglês <i>reactive oxygen species</i> )
<b>SERT</b>	Transportador de 5-HT
<b>SDS-PAGE</b>	Eletroforese em gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE, do inglês <i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i> )
<b>SFBR</b>	Simple, fácil, barato e racional
<b>TEPT</b>	Transtorno de estresse pós-traumático
<b>UHD</b>	Ultra alta definição (4K)

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	20
1.1	TRANSTORNO DE ESTRESSE PÓS-TRAUMÁTICO.....	20
1.2	DISTRESSE E REGULAÇÃO EIXO HIPOTALÂMICO-HIPOFISÁRIO-ADRENAL.....	23
1.3	ANSIEDADE E DEPRESSÃO NO TRANSTORNO DE ESTRESSE PÓS-TRAUMÁTICO.....	25
1.4	FISIOPATOLOGIA DO TRANSTORNO DE ESTRESSE PÓS-TRAUMÁTICO.....	27
1.5	NEUROINFLAMAÇÃO E FATORES NEUROTÓFICOS.....	28
1.6	SISTEMA SEROTONÉRGICO E SEU PAPEL NA HOMEOSTASE NEURONAL.....	30
1.7	MODELOS ANIMAIS DE TRANSTORNO DE ESTRESSE PÓS-TRAUMÁTICO.....	34
<b>2</b>	<b>PRODUTOS NATURAIS</b> .....	36
2.1	ÁCIDO ROSMARÍNICO.....	37
<b>3</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b> .....	42
<b>4</b>	<b>OBJETIVO</b> .....	44
4.1	OBJETIVO GERAL.....	44
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	44
<b>5</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	45
5.1	ANIMAIS.....	45
5.2	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	45
5.3	AValiação comportamental .....	47
5.4	LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO.....	50
5.5	ESQUIVA INIBITÓRIA NO APARATO <i>STEP DOWN</i> .....	49

5.6	COLETA DE SANGUE, OBTENÇÃO DE PLASMA SANGUÍNEO E DISSECÇÃO CEREBRAL.....	52
5.7	PROCESSAMENTO E QUANTIFICAÇÃO DE CORTICOSTERONA PLASMÁTICA POR HPLC UV-VIS.....	53
5.8	QUANTIFICAÇÃO DE FATORES NEUOTRÓFICOS DERIVADO DO CÉREBRO E GLIA NO HIPOCAMPO VIA WESTERN-BLOT.....	53
5.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	54
<b>6</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>56</b>
6.1	AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL .....	56
6.2	EFEITO ANSIOLÍTICO DO AR NO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO.....	62
6.3	AVALIAÇÃO DE MEMÓRIA E APRENDIZADO NA ESQUIVA INIBITÓRIA..	63
6.4	NÍVEIS PLASMÁTICOS DE CORTICOSTERONA.....	64
6.5	EXPRESSÃO DOS FATORES NEUOTRÓFICOS DO HIPOCAMPO.....	66
<b>7</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>69</b>
<b>8</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÃO.....</b>	<b>80</b>
<b>9</b>	<b>PERSPECTIVAS.....</b>	<b>81</b>
<b>10</b>	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>82</b>
<b>11</b>	<b>MATERIAL SUPLEMENTAR.....</b>	<b>101</b>
<b>12</b>	<b>ANEXOS.....</b>	<b>108</b>

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 TRANSTORNO DO ESTRESSE PÓS-TRAUMÁTICO

A história dos traumas psíquicos na sociedade nos últimos 200 anos é sempre trazida à tona principalmente após acontecimentos históricos de guerras, além dos crescentes episódios de violência física e sexual (HERMAN, 1992).

Em 1893, Freud, em seus estudos sobre a histeria, apresentou o conceito de trauma, em que o trauma psíquico, mas não o dano físico, seria o responsável pela causa da doença. Essa noção de trauma passou a ser entendida como algo capaz de desencadear manifestações patológicas (FREUD, 1972).

Entretanto, foi com os estudos do neurologista Jean-Martin Charcot (1825-1893) e seus dois discípulos Pierre Janet (1859-1947) e Sigmund Freud (1856-1939) com pacientes traumatizados, o início dos debates relacionados à etiologia traumática e a sua proveniência orgânica e/ou psicológica. Janet passou então a discutir, integrar e escrever os mecanismos de dissociação, traumas e histeria, definindo a compreensão bastante contemporânea de que o gatilho do transtorno mental iniciaria em mentes que se mostravam incapazes de parear as experiências aterrorizantes com os esquemas cognitivos prévios e “subconscientes” (conjunto de memórias envolvidas na formação e ordenação dos esquemas mentais que guiam a interação da pessoa e meio ambiente), gerado por estados de excitação extremos (*hipearousal*), causando o fracasso na integração fisiológica de memórias traumáticas, bem como sua difícil extinção e constante intromissão na consciência como percepções de terror, preocupações obsessivas e revivências somáticas de forma ansiosa (SCHESTATSKY *et al.*, 2003).

As primeiras descrições do Transtorno de Estresse Pós-Traumático (TEPT) remetem à guerra civil americana (1861-1865) em que soldados veteranos passavam a apresentar arritmia cardíaca, bem como um comportamento hipervigilante que não era evidenciado antes da experiência em combate. Entretanto, apenas em meados da década de 80 o termo TEPT foi introduzido no contexto científico primeiramente nos EUA, e posteriormente na Europa ocidental (LIPOV e KELZEMBERG, 2012).

O Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtorno Mental (DSM) lista diferentes categorias de transtornos mentais e critérios para diagnóstico e vem sendo constantemente alterado à medida que novos dados científicos se apresentam. Na sua 3ª edição publicada pela Associação Psiquiátrica Americana (APA) em 1980, o conceito de TEPT relaciona-se a eventos traumáticos que acarretavam prejuízo à saúde física e mental. Tal conceito baseia-se nas observações do psiquiatra Abram Kardiner (1891-1981) observar diversas alterações comportamentais (angústia, isolamento social, depressão, suicídio, dentre outros) em soldados que voltavam dos campos de batalha após o fim da 2ª Guerra Mundial, compiladas no livro “As Neuroses Traumáticas de Guerra em 1941 (APA, 1980; SBARDELLOTO *et al.*, 2011; SCHESTATSKY *et al.*, 2003).

No DSM, o TEPT é considerado uma disfunção biopsicossocial que impacta severamente na qualidade de vida do indivíduo (BERGER *et al.*, 2007; CLAPP *et al.*, 2008; WARSHAW *et al.*, 1993). Ele pode surgir após uma ou várias experiências traumáticas, tais como: assaltos, sequestros, acidentes, guerras, violência sexual e/ou física, com risco de quase morte. Dentre os critérios de diagnóstico incluem-se revivência do evento traumático inicial, evitar locais, objetos ou estímulos associados ao evento estressante e uma hiperexcitação que não estava presente no indivíduo antes do evento (APA, 2000).

De acordo com o DSM-V, o TEPT “caracteriza-se pela revivência de um evento extremamente traumático, acompanhada por sintomas de excitação aumentada e esquiva de estímulos associados ao trauma”. Nessa versão mais atualizada, o diagnóstico foi estendido às pessoas cujo familiar ou pessoas com grande proximidade sofreram exposição a detalhes aversivos de eventos traumáticos, tais como os paramédicos e outros profissionais de saúde. Também foi retirado o critério A2 do DSM-IV em que era exigido que o evento fosse vivenciado com intenso medo, impotência ou horror por não ser relevante quanto ao diagnóstico e prognóstico da patologia (APA, 2013).

As terapias farmacológicas para o TEPT incluem uma vasta gama de medicamentos. Destes podem-se incluir: inibidores seletivos da recaptação da serotonina (ISRS), noradrenalina (ISRN), inibidores da monoamina oxidase (IMAO), antidepressivos

tricíclicos (TCA), agentes adrenérgicos, benzodiazepínicos, estabilizadores de humor e antipsicóticos atípicos (DASKALAKIS, YEHUDA, DIAMONDS, 2013). Atualmente, o tratamento de escolha para os pacientes que sofrem de TEPT são os antidepressivos, especialmente os inibidores seletivos da recaptação da serotonina (ISRS), os quais vêm demonstrando certa eficácia no alívio dos sintomas e prevenção de recaída nos pacientes. (BERGER *et al.*, 2009; CORCHS *et al.*, 2009; SCHNEIER *et al.* 1997).

Alterações únicas são encontradas em pacientes com TEPT, como por exemplo, revivência do evento traumático, que interfere na resposta individual à medicação, além disso, um paciente pode precisar de fármacos diferentes no decorrer do tratamento, dependendo dos sintomas que forem mais proeminentes em determinado momento (SEGAL, 1979; KOSTEN *et al.*, 1987; MARTINEZ *et al.*, 2007; SOUTHWICK *et al.*, 1991; SOUTHWICK *et al.*, 1993).

Dessa forma, autores propõem a seguinte associação entre as dimensões psicopatológicas do TEPT e a resposta aos diferentes fármacos:

- a) os sintomas de revivência do trauma normalmente mostram melhor resposta aos antidepressivos tricíclicos como a imipramina;
- b) a esquiva a estímulos relacionados ao trauma e distanciamento afetivo, aos inibidores seletivos da recaptação da serotonina (ISRS), como por exemplo, a sertralina;
- c) a hiperestimulação autonômica, aos betabloqueadores e agonistas alfa-2-adrenérgicos (FRIEDMAN, 1988; DAVIDSON, 1992; KATZ *et al.*, 1996; VIOLA *et al.*, 1997; NUTT, 2000; KARL *et al.*, 2006).

Os inibidores seletivos de recaptação de serotonina (ISRS), como a sertralina, são os fármacos que apresentam melhor resposta no TEPT, portanto a medicação de primeira escolha (ALBUCHER & LIBERZON, 2002). O tratamento tido como padrão ouro para o TEPT consiste na combinação de Terapia Cognitivo Comportamental (TCC) e ISRS, porém, estes alcançam apenas algo em torno de 50% de remissão completa dos sintomas. Tal fato tem motivado a constante procura por novas formas



de tratamento, tanto psicoterápicas quanto farmacológicas, essenciais no tratamento do TEPT (NAJAVITS, 2015).

Estudos pré-clínicos e clínicos mostram que ocorrem, no TEPT, algumas alterações no Sistema Nervoso Central (SNC) envolvendo diversos neurotransmissores, tais como, serotonina (5-HT), ácido gama-aminobutírico (GABA), glutamato, dentre outros (KIM; GORMAN, 2005).

## 1.2 DISTRESSE E REGULAÇÃO EIXO HIPOTALÂMICO-HIPOFISÁRIO-ADRENAL

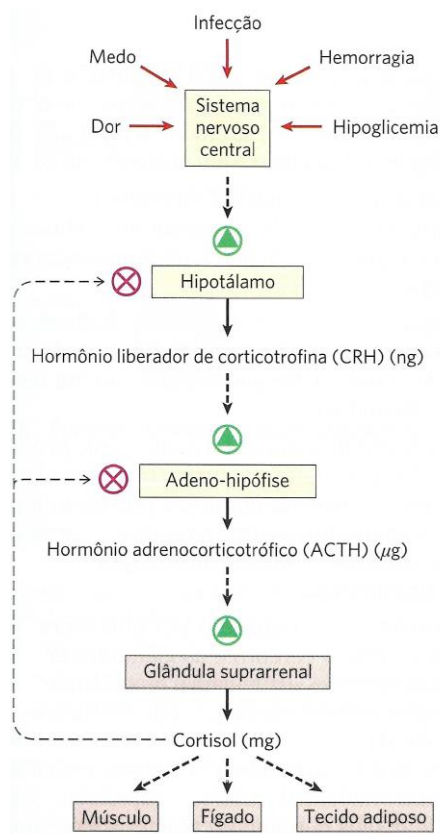
Distresse é uma palavra relativamente nova na história da psiquiatria e sem definições claras, porém amplamente utilizando no sistema do DSM e em menor extensão na Classificação Estatística Internacional de Doenças e Problemas Relacionados com a Saúde (CID). O distresse pode ser definido na maioria dos casos como comprometimento funcional, ou seja, quando o eustresse ou estresse fisiológico e necessário para a manutenção do indivíduo chega a patamares de maladaptação e comprometimento da saúde do indivíduo, trazendo tanto alterações psicológicas quanto físicas e conseqüentemente um quadro patológico (PHILLIPS, 2009).

Diversos agentes estressores (**Figura 1**) como medo, dor, ansiedade, infecção, hemorragia, hipoglicemia, jejum podem estimular a liberação do hormônio corticosteróide (cortisol) produzido na zona fasciculada do córtex da glândula suprarrenal e liberado na corrente sanguínea. O cortisol tenta suprir o organismo com combustível (glicose) a fim de resistir às situações estressantes. A ação do cortisol é lenta e altera o metabolismo pela mudança nos tipos e quantidades de certas enzimas sintetizadas em suas células-alvo, tem capacidade de atravessar as membranas como qualquer esteróide e combinando-se ao receptor glicocorticoide presente no núcleo ou citoplasma de forma não covalente, altera sua conformação estrutural na qual o complexo gerado se liga ao elemento regulador dos glicocorticoides ativando ou não a transcrição gênica. De tal forma o cortisol não é capaz de regular a atividade de moléculas enzimáticas já existentes (NELSON e COX, 2019).

O mecanismo de ação do eixo hipotalâmico-hipofisário-adrenal (HHA), onde os neurônios do núcleo paraventricular do hipotálamo sintetizam e liberam o hormônio liberador de corticotrofina (CRH) o principal hormônio regulador dessa cascata. A secreção de CRH exige ritmo circadiano, ao qual se sobrepõem os efeitos do estresse. As fibras excitatórias da amígdala transmitem as informações relacionadas ao estresse e ativam a biossíntese e a secreção de CRH, as fibras inibitórias vêm do hipocampo (KANDEL *et al.*, 2013).

Da mesma forma que uma via biossintética, em níveis da cascata hormonal, existe uma autorregulação através da retroalimentação negativa das etapas anteriores, na qual o aumento da concentração desnecessária do último hormônio ou de um intermediário inibe a síntese dos hormônios anteriores na cascata (**Figura 1**), dessa forma um produto é sintetizado ou liberado até que se alcance a concentração desejada (NELSON e COX, 2019).

**Figura 1** - Cascata de liberação de hormônios em consequência da estimulação do hipotálamo pelo sistema nervoso central.



Fonte: NELSON e COX, 2019.

O estresse psicológico repetitivo, experiências traumáticas e a privação do sono podem também causar estresse oxidativo e danos mitocondriais ao cérebro (DU *et al.*, 2009, JOU *et al.*, 2009, SU *et al.*, 2008b, ZHANG *et al.*, 2006). Tais alterações já foram descritas na maioria dos estudos envolvendo ensaios clínicos de civis e abrange uma ampla faixa etária (DU *et al.*, 2016).

As respostas fisiológicas ao estresse são reguladas por diversas vias tais como a ativação do sistema nervoso simpático, o eixo HHA e a resposta comportamental de luta ou fuga (MIFSUD e REUL, 2018). Entretanto o distresse ou exposição crônica ao estresse pode causar reações maladaptativas, incluindo depressão, ansiedade, comprometimento cognitivo e doenças cardíacas (KETCHESIN, STINNETT e SEASHOLTZ, 2017).

### 1.3 ANSIEDADE E DEPRESSÃO NO TRANSTORNO DE ESTRESSE PÓS-TRAUMÁTICO

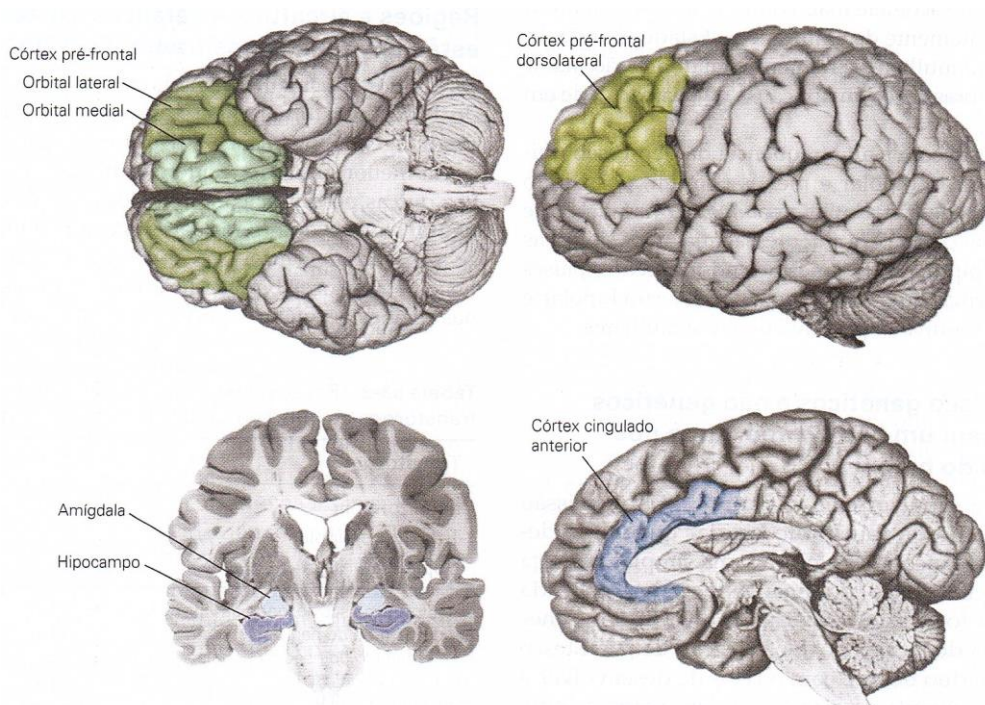
Ansiedade e distúrbios relacionados são normalmente caracterizados por episódios de ansiedade excessiva, medo, preocupação e evasão. Enquanto a ansiedade pode ser uma resposta quase sempre normal do cotidiano, transtornos com comorbidade de ansiedade estão ligados a um comprometimento funcional. A ansiedade de tal forma toma proporções com sintomas que causam sofrimento clinicamente significativo ou compromete em âmbito social, profissional ou outro (APA, 2013).

A depressão, uma desordem de saúde mental caracterizada por humor deprimido persistente ou perda do interesse em atividades e prazer (anedonia), e o distresse estão inter-relacionados, pois em alguns casos a depressão resulta de uma experiência estressante. Não obstante, a experiência de depressão é por si só estressante. Além disso, a depressão compartilha várias características com o estresse crônico, incluindo mudanças no apetite, no sono e na disposição (KANDEL *et al.*, 2013). Depressão maior, um tipo mais grave de depressão, e estresse crônico também podem compartilhar alterações fisiológicas importante como a atividade persistente do eixo HHA (KANDEL *et al.*, 2013).

A produção diária de cortisol, hormônio glicocorticoide liberado durante o estresse, e a secreção do CRH e do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) também podem estar elevados em indivíduos depressivos, assim como no TEPT (KANDEL *et al.*, 2013).

Importantes centros encefálicos, entre eles a amígdala o hipocampo, o córtex pré-frontal (CPF) e o córtex cingulado anterior (CCA) que são responsáveis pelas emoções (**Figura 2**), sofrem alterações em pacientes com depressão. Cada uma destas estruturas interconectadas desempenha um papel na regulação das emoções e das respostas fisiológicas e comportamentais a um estímulo emocional. Anormalidades em uma ou mais destas regiões, ou na interconexão entre elas, estão associadas com falhas na regulação das emoções (KANDEL *et al.*, 2013; DAVIDSON, PUTNAM e LARSON, 2000).

**Figura 2** - Estruturas encefálicas envolvidas na circuitaria de regulação emocional.

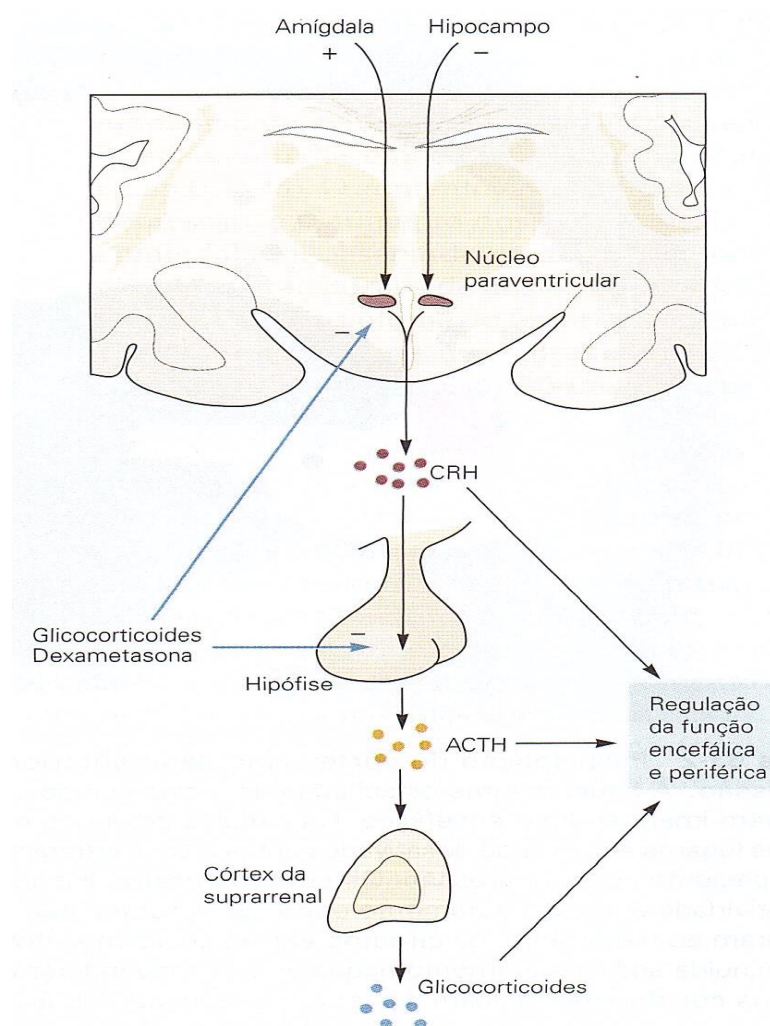


Fonte: KANDEL *et al.*, 2013; DAVIDSON, PUTNAM e LARSON, 2000. DEARMOND; FUSCO e DEWEY, 1989.

## 1.4 FISIOPATOLOGIA DO TRANSTORNO DE ESTRESSE PÓS-TRAUMÁTICO

Estudos de neuroimagem sugerem que um dos mecanismos subjacentes ao TEPT é a plasticidade neuronal exacerbada, que, originalmente é à base da aprendizagem e da memória (LANIUS *et al.*, 2006; FRANCATI, VERMETTEN e BREMNER, 2007; PAPE e PARE, 2010; SHUMYATSKY *et al.*, 2005).

**Figura 3** - Desregulação no eixo hipotalâmico-hipofisário-adrenal envolvido no TEPT.



Fonte: KANDEL *et al.*, 2013.

A fisiopatologia do TEPT à nível de SNC compreende uma neurocircuitaria específica e sugere uma hipoativação do CPF, englobando o CCA, córtex pré-frontal ventromedial (CPFvm), córtex subcaloso e córtex orbitofrontal, resultando na incapacidade de controle eficaz à resposta de estímulos relacionados ao trauma. A amígdala se torna hiperativa emitindo constante sinal de alarme que resulta em

constante ativação do eixo HHA, quando este já deveria diminuir suas atividades (**Figura 3**). Essa hiperativação também estaria ligada à ocorrência de lembranças vividas e sintomas de hiperexcitação (RAUCH *et al.*, 1998; RAUCH *et al.*, 2006). O funcionamento anormal do hipocampo, envolvido em déficits de aprendizagem e memória, resulta na incapacidade de extinção do medo (PATEL *et al.*, 2012).

### 1.5 NEUROINFLAMAÇÃO E FATORES NEUROTRÓFICOS

Desde o tempo de Aristóteles acredita-se haver uma relação entre a mente e o corpo, como complementares entre si e capazes de provocarem alterações funcionais de forma bidirecional. Mais tarde, estudos avaliaram a capacidade de influência do Sistema Nervoso Central (SNC) sobre o sistema imunológico (SI), sendo esta área de estudo denominada de “neuroimunomodulação” ou “psiconeuroimunologia” (PINHEIRO, 2008).

Entretanto, acreditava-se que essa interação se desse de forma unidirecional, fato esse refutado posteriormente, por meio de crescentes evidências acerca da capacidade do sistema imunológico em influenciar o funcionamento do SNC. A relação entre SI e SNC mostrou ter grande relevância no desenvolvimento de distúrbios neuropsiquiátricos e neurológicos, bem como em alterações comportamentais, tais como o TEPT (PACE, HEIM, 2011). Acredita-se há uma correlação entre o estresse, a ansiedade e a inflamação, portanto, é pertinente supor que a resposta imunológica esteja envolvida na fisiopatologia do TEPT bem como em outras comorbidades (JONES, THOMSEN, 2013).

Alterações nas concentrações de citocinas no SNC podem gerar mudanças comportamentais, tanto em roedores quanto em humanos, na forma de "comportamento de doença" (DANTZER, 2001; PARNET *et al.*, 2002). Tal comportamento é uma estratégia altamente organizada do organismo para o combate de processos infecciosos. Em roedores, o comportamento de doença é caracterizado por letargia, diminuição do interesse pelo ambiente, isolamento social e redução da ingestão de alimentos e água (DANTZER *et al.*, 2008; MILLER *et al.*, 2009).

Entre os mediadores inflamatórios, os mais extensivamente estudados são as interleucinas 1beta (IL-1 $\beta$ ), interleucina 6 (IL-6) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) (JONES, THOMSEN, 2013). E já foi evidenciado por meio de dosagem no plasma de pacientes depressivos com comportamentos suicidas elevação significativamente maior das citocinas pró-inflamatória IL-6 e TNF- $\alpha$  em comparação com pacientes depressivos sem comportamento suicida (JANELIDZE *et al.*, 2011; GHANSHYAM *et al.*, 2012).

Em modelos animais, da mesma forma, a relação entre os sintomas de comportamento doentio induzido por citocinas e depressão é grande. Em ambos os casos, ocorre isolamento social, mal-estar e anedonia (STEPANICHEV *et al.*, 2014). A esses fatores, soma-se o fato de que alguns componentes do comportamento da doença, como a diminuição da preferência de soluções doces e exploração social reduzida, são melhoradas por fármacos antidepressivos. No entanto, a semelhança entre comportamento de doença e depressão é apenas parcial. O “comportamento do tipo doentio” é normalmente uma resposta adaptativa à infecção por agentes patogênicos e é reversível, uma vez que o agente é eliminado, porém tal fato não ocorre na depressão estabelecida por alterações nas concentrações de monoaminas (STEPANICHEV *et al.*, 2014).

Os fatores neurotróficos também estão envolvidos nos processos de neuroinflamação e são compostos por duas famílias principais, a das neurotrofinas (NTs) e a do fator neurotrófico derivado da glia (GDNF), do inglês *glial cell line-derived neurotrophic factor*, cujos componentes podem atuar de forma isolada ou conjuntamente nos processos de regeneração de fibras nervosas lesadas (BRAUN, 2014).

As alterações nas concentrações de neurotrofinas, como o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), do inglês *brain-derived neurotrophic factor*, no hipocampo e regiões corticais pré-frontais, tem sido implicada numa ampla variedade de doenças psiquiátricas tais como esquizofrenia, depressão maior, transtorno bipolar e TEPT (ZHANG, LI, HU, 2016; GREEN, CORSITRAVALI, NEUMEISTER, 2014).

No TEPT, mudanças ocorridas na via das neurotrofinas têm sido relacionadas com implicações na aprendizagem contextual, expressão e extinção do medo. O desenvolvimento de alguns dos sintomas clínicos do TEPT, tais como memórias intrusivas, hiperexcitação e medo exacerbado podem estar relacionados parcialmente com alterações envolvendo o BDNF (GREEN, CORSITRAVALI, NEUMEISTER, 2014).

As principais funções desempenhadas pelo BDNF incluem o aumento da plasticidade, sobrevivência e crescimento celular, dentre outras. Possuindo grande importância na neurogênese, seu bloqueio no hipocampo reduz a aprendizagem de medo contextual, o que poderia explicar alguns dos sintomas do TEPT, tais como a revivência de memórias aversivas em contextos inadequados, sendo ele necessário para a extinção dessas memórias (GREEN, CORSI-TRAVALI, NEUMEISTER, 2013).

Por sua vez, o GDNF é encontrado principalmente nas regiões cerebrais do estriado e áreas prosencefálicas, e é considerado um dos mais eficazes fatores neurotróficos de neurônios dopaminérgicos (AIRAKSINEN e SAARMA, 2002). O GDNF possui capacidade neuroprotetora em populações de neurônios periféricos e centrais (AIRAKSINEN e SAARMA, 2002), além do envolvimento no desenvolvimento e manutenção de células gliais, serotoninérgicas e dopaminérgicas (DUCRAY et al, 2006) e na regulação de vias noradrenérgicas e GABAérgicas (SARABI et al., 2000).

## 1.6 SISTEMA SEROTONÉRGICO E SEU PAPEL NA HOMEOSTASE NEURONAL

As drogas da classe dos ISRS são os medicamentos de primeira escolha no tratamento dos transtornos mentais ligados a traumas, humor e ansiedade, dentre eles o TEPT, o transtorno de ansiedade generalizada (TAG) e transtorno de pânico (TP). O que aponta a 5-HT como o neurotransmissor especializado no controle dos estados aversivos dentro da evolução (DEAKIN e GRAEFF, 1991).

A 5-HT é um neurotransmissor distribuído em todo o SNC, sua síntese é dependente do aminoácido triptofano no núcleo da rafe do mesencéfalo, ponte e bulbo, por meio

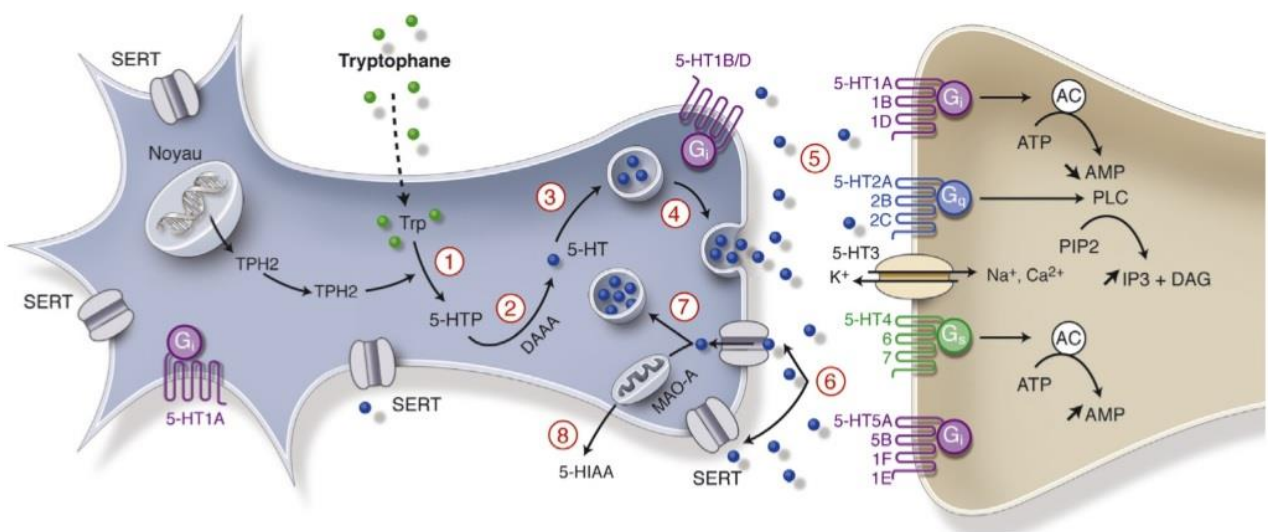


da recaptura ativa do triptofano do plasma a partir de carreadores de aminoácidos neutros da BHE, o qual é convertido em 5-hidroxitriptofano (5-HTP) por ação da enzima triptofano-hidroxilase que adiciona uma hidroxila ao anel aromático na posição cinco (BLUNDELL, 1992).

A via serotoninérgica é altamente complexa, possui mais de 14 tipos de receptores pré e/ou pós-sinápticos, cuja ativação é capaz de produzir efeitos antagônicos, tornando complexo o entendimento da ação dessa via em transtornos psiquiátricos (HOYLER *et al.*, 2002). Além disso, a serotonina possui caráter hidrofílico e não possui propriedade de ultrapassar a barreira hematoencefálica (BHE) (BLUNDELL, 1992).

A 5-hidroxitriptamina/serotonina/5-HT é então produzida a partir do 5-HTP por meio da descarboxilase do aminoácido L-aromático (AADC) (EATON E GUDEHITHLU *et al.*, 1993; AZMITIA, 1999) e é armazenada em vesículas via processo realizado por bomba de prótons do transportador vesicular de monoaminas (VMAT). Quando há impulso nervoso ocorre a despolarização do neurônio serotoninérgico e influxo de  $Ca^{2+}$ , a 5-HT é liberada por exocitose na fenda sináptica (**Figura 4**), ou seja, é um processo cálcio dependente cuja liberação é mediada por auto-receptores posicionados nos neurônios pré-sinápticos que modulam a liberação de 5-HT detectando a concentração desse no meio extracelular (RAYMOND *et al.*, 2001).

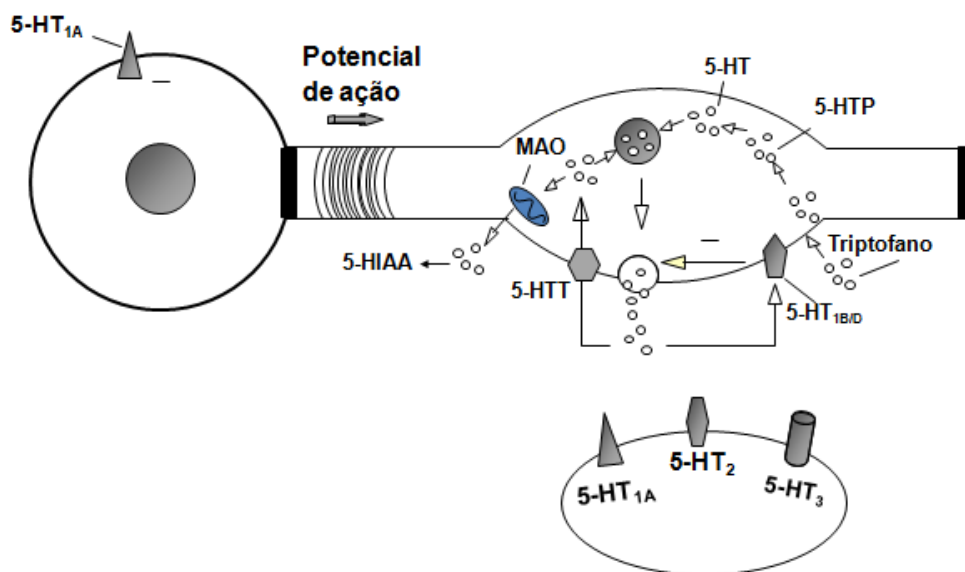
**Figura 4** - Representação esquemática da síntese de 5-HT a nível central.



Fonte: David e Gardier, 2016.

A cessação da ação da 5-HT pode ocorrer mediante o processo da remoção do neurotransmissor pelo transportador de 5-HT (SERT), uma proteína transmembrânica transportadora seletiva de 5-HT  $\text{Na}^+/\text{Cl}^-$  dependente responsável pela recaptura da 5-HT, regulando os níveis do neurotransmissor e sua ação na sinapse, mantendo a homeostase do sistema (BLAKELY *et al.*, 1994; BOROWSKY e HOFFMAN, 1995). Já o outro processo é controlado por degradação enzimática intracelular através da monoamina oxidase (MAO) (**Figura 4 e 5**), essa enzima encontra-se no terminal pré-sináptico, principalmente, na membrana mitocondrial, convertendo 5-HT em ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA), seu principal metabólito (COOPER *et al.*, 1991) (**Figura 5**).

**Figura 5** - Neurotransmissão serotonérgica.



Fonte: Modificado de Graeff e Guimarães, 1999.

A 5-HT pode atuar em receptores chamados de 5-HT1, 5-HT2, 5-HT3, 5-HT4, 5-HT5, 5-HT6 ou 5-HT7 pós-sinápticos. Existem ainda receptores pré-sinápticos inibitórios do tipo 5-HT1A, localizados nos corpos celulares, e os tipos 5-HT1B/D (varia da espécie), nos terminais nervosos dos neurônios serotonérgicos. Todos esses receptores são acoplados à proteína G, exceto o 5-HT3 que é ligado a canal iônico (GRAEFF e GUIMARÃES, 1999).

Alguns receptores serotoninérgicos possuem interesses farmacológicos descritos na literatura, como os elencados na **Tabela 1**, sendo que fármacos desenvolvidos com ação direta sobre receptores serotoninérgicos metabotrópicos (Tab. 1, quadro 1) e ação indireta (Tab. 1, quadro 2) possuem predominantemente ação ansiolítica, antidepressiva, bipolaridade, humor, insônia e em efeitos colaterais motores, enquanto os fármacos com ação direta no receptor serotoninérgico canal iônico (Tab. 1, quadro 3) possui efeito basicamente em quadros de náuseas e vômitos resistentes (STAHL, 2014).

**Tabela 1** - Receptores serotoninérgicos de interesse farmacológico.

Receptor ligado às proteínas G e subtipo farmacológico que atuam como alvos diretos	Ação farmacológica	Classe de substâncias/fármacos	Ação terapêutica
5HT <sub>2A</sub>	Antagonista ou agonista inverso	Antipsicótico atípico	Redução dos efeitos colaterais motores; possíveis ações estabilizadoras do humor e antidepressivas no tratamento do transtorno bipolar
5HT <sub>1A</sub> 5HT <sub>1B/D</sub> 5HT <sub>2C</sub> 5HT <sub>6</sub> 5HT <sub>7</sub>	Antagonista ou agonista parcial	Antidepressivo, hipnótico Antipsicótico atípico	Melhora o humor e a insônia Ações desconhecidas sobre receptores secundários, que contribuem possivelmente para a eficácia e a tolerabilidade
5HT <sub>1A</sub>	Agonista parcial	Ansiolítico	Ansiolítico; reforço da ação antidepressiva
5HT <sub>1A</sub> (autoreceptores somatodendríticos pré-sinápticos)	Agonista por meio do aumento da própria serotonina de todos os receptores de serotonina	Antidepressivo (ações nos transportadores de serotonina, SERT)	Antidepressivo, ansiolítico
Receptores pós-sinápticos 5HT <sub>2A</sub> ; possivelmente, pós-sinápticos 5HT <sub>1A</sub> , 5HT <sub>2C</sub> , 5HT <sub>6</sub> , 5HT <sub>7</sub>			
5HT <sub>3</sub>	Antagonista	Antidepressivo (mirtazapina)	Desconhecida; redução das náuseas
5HT <sub>3</sub>	Antagonista	Antiemético	Redução de vômitos induzidos por quimioterapia

Fonte: Adaptado de Stahl, 2014.

## 1.7 MODELOS ANIMAIS DE TRANSTORNO DE ESTRESSE PÓS-TRAUMÁTICO

Alguns modelos animais são utilizados para representar um quadro típico de TEPT dentre os sintomas destacam-se: medo condicionado ou outros como exposição única e prolongada a um evento estressante, exposição a predadores ou exposição ao odor do predador (WANG *et al.*, 2012).

O choque elétrico inescapável nas patas é um dos paradigmas utilizados nos estudos de TEPT objetivando estudar as alterações comportamentais e bioquímicas, assim como o efeito de substâncias ativas em relação a essas modificações (LI *et al.*, 2006).

A indução de sucessivos choques elétricos nas patas de camundongos da linhagem ICR, seguida de reexposição deste evento aversivo, foi capaz de promover alterações comportamentais nos testes do labirinto em cruz elevado e na caixa clara e escura (ambos os testes preditivos de ansiedade) por até 4 semanas após o protocolo de choques, e até 2 semanas após a última reexposição do evento traumático (LI *et al.*, 2006).

Não obstante, também foram observadas alterações no sono destes animais, mostrando diminuição dos períodos (episódios) de sono por até 21 dias. Além disso, a exploração de objetos por animais condicionados ao estímulo de choque sofre significativa diminuição em relação ao grupo controle, resposta preditiva de medo excessivo (PHILBERT *et al.*, 2011).

Tal como ocorre em seres humanos portadores do transtorno, na experimentação animal, evidencia-se importante diminuição do volume do hipocampo em animais submetidos ao modelo de indução de TEPT em comparação aos animais do grupo controle (PYNOS *et al.*, 1996; BACHMANN *et al.*, 2005). Estudos de imagem por ressonância magnética (RM) sugerem esse processo de atrofia evidenciado na alteração morfológica devido à ativação de mecanismos de morte celular programada - apoptose neuronal (ZHANG *et al.*, 2006).

Na indução do modelo de TEPT os eventos de estresse mais comumente utilizados são a exposição ao odor do predador ou ao próprio predador, estresse único e prolongado e choque inescapável nas patas (DASKALAKIS, YEHUDA, DIAMOND, 2013). Por apresentar notável validade de face e predição, o choque inescapável nas patas é destacado um dos melhores paradigmas para produzir trauma e para induzir o TEPT em animais (BALI, JAGGI, 2015). Dessa forma, o modelo de choque inescapável nas patas foi o adotado para a realização desse trabalho.

## 2 PRODUTOS NATURAIS

Os produtos naturais, principalmente derivados de plantas, constituem a procedência de agentes terapêuticos importantes e presentes em costumes populares de forma empírica, os quais são prescritos com frequência pelos seus efeitos medicinais característicos, mesmo que não tenha seus efeitos científicos atestados (CALIXTO, 2000; CALIXTO *et al.*, 2001). Além disso, o avanço da terapêutica atual, basicamente constituída por fármacos com ações específicas sobre receptores, enzimas e canais iônicos, não teria se desenvolvido se não fosse a contribuição dos produtos naturais (CALIXTO *et al.*, 2001).

A descrição de alguns dos efeitos destas substâncias, bem como a investigação de seu mecanismo de ação tornou-se viável através da disponibilidade de princípios ativos puros quimicamente, aliado aos avanços na fisiologia experimental no século XIX. Como exemplos, tem-se a atropina, princípio ativo isolado da planta *Atropa belladonna*; a reserpina, princípio ativo extraído da planta *Rauwolfia serpentina*. Outros princípios são o curare (isolado de *Chondodendron tomentosum*), nicotina (espécies de *Nicotiniana*), ergotamina (espécies do Ergot), cocaína (espécies de *Erythroxylium*), morfina (*Papaver somniferum*), glicosídeos cardíacos (espécies de *Digitalis*), efedrina (*Ephedra sinica*); além do ácido salicílico, proveniente da planta *Salix alba* (FARNSWORTH, 1966; GILANI; RAHMAN, 2005; NEWMAN; CRAGG; KINGSTON, 2008).

O Brasil destaca-se com aproximadamente 20 a 22% de todas as plantas e microorganismos do planeta, sendo o o país que detém a maior biodiversidade do mundo. Entretanto, 10% das espécies de plantas ou de seus produtos foram alvo de pesquisa científica (CALIXTO *et al.*, 2005). Logo, a pesquisa de novos compostos com interesse terapêutico a partir de recursos da biodiversidade brasileira é fundamental, impulsionando o desenvolvimento da indústria nacional, protegendo os recursos naturais, fomentando o crescimento da fitoterapia no país, além de trazer prerrogativas para a população brasileira no que corresponde à aquisição de medicamentos com eficácia comprovada. Dentre as inúmeras substâncias isoladas de plantas medicinais com potencial para o desenvolvimento de um fitomedicamento, podemos citar o ácido rosmarínico.

## 2.1 ÁCIDO ROSMARÍNICO

O ácido rosmarínico (AR) foi isolado pela primeira vez em 1958, das folhas da *Rosmarinus officinalis* L, de onde surgiu seu nome (SCARPATI; ORIENTE, 1958). Este composto é um ester de origem natural, derivado do ácido caféico e do ácido R-(+)-3-(-3,4-dihidroxifenil) lático que se acumula em porções altas de muitas espécies de plantas (**Figura 6**). O AR é abundante em muitas plantas da família Lamiaceae, como a *Rosmarinus officinalis* L., *Spearmint* (*Mentha* spp), *Melissa officinalis* e também em plantas usadas na medicina tradicional chinesa, como a *Perilla frutescens* (L). Britton, *Salvia miltiorrhiza* Bunge e *Rabdosia rubescens* (Hemls) (SOLOMON; AMOAH, 2016).

**Figura 6** - Espécies de plantas que contém o Ácido Rosmarínico: 1. *Rosmarinus officinalis* L.; 2. *Melissa officinalis* L.; 3. *Salvia officinalis* L.; 4. *Mentha arvensis*.



Fonte: Banco de imagens do Google, 2017.

O AR também é encontrado nas seguintes espécies de plantas:

Tabela 2 - Outras espécies de plantas que contém o AR

Espécie	Nome popular	Espécie	Nome popular	Espécie	Nome popular
<i>Glechoma hederacea</i>	erva-terrestre	<i>Momordica charantia</i>	melão-de-são-caetano	<i>Rabdosia serra</i>	rabdósia
<i>Lavandula angustifolia</i>	lavanda	<i>Monarda didyma</i>	bergamota	<i>Salvia officinalis</i>	sálvia
<i>Lippia alba</i>	erva cidreira, chá de tabuleiro	<i>Nepeta cataria</i>	gataria	<i>Satureja hortensis</i>	segurelha
<i>Lippia graveolens</i>	orégano mexicano	<i>Ocimum basilicum</i>	manjeriço	<i>Symphytum officinalis</i>	confrei
<i>Lippia origanoides</i>	salva de Marajó	<i>Origanum vulgare</i>	orégano	<i>Thymus serpyllum</i>	tomilho selvagem
<i>Majorana hortensis</i>	manjerona	<i>Orthosiphon aristatus</i>	ortosifão	<i>Thymus vulgaris</i>	tomilho
<i>Mentha arvensis</i>	hortelã	<i>Petroselinum crispum</i>	salsinha	<i>Verbascum phlomoides</i>	Verbasco
<i>Mentha piperita</i>	hortelã pimenta	<i>Passiflora edulis</i>	maracujá		
<i>Mentha spicata</i>	hortelã-peluda	<i>Phillyrea latifolia</i>	aderno		

Fonte: PETERSON E SIMMONDS, 2003; KOMES *et al.*, 2011; ROY; MUKHOPADHYAY, 2012; AYRANCI; ERKAN, 2013; SALTAS *et al.*, 2013; STASSHENKO *et al.*, 2013.

A utilização de vegetais com a presença do AR se deve a suas múltiplas atividades farmacológicas e biológicas importantes. Nos últimos anos diversos estudos científicos têm explorado essas propriedades, desde estudos *in vitro* até ensaios clínicos (PETERSEN e SIMMONDS, 2013; AMOAH *et al.*, 2016; CHOI *et al.*, 2002; QIAO *et al.*, 2005).

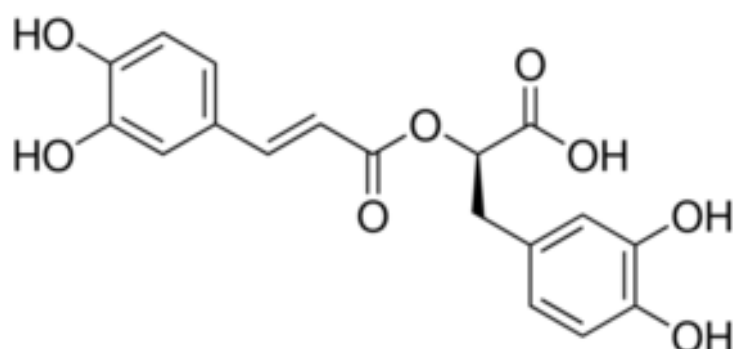
Uma importante característica do AR é sua excepcional atividade antioxidante (PETERSEN e SIMMONDS, 2013), bem como seus efeitos nas vias de sinalização celular e expressão gênica, contribuindo para suas principais propriedades biológicas (AMOAH *et al.*, 2016). O perfil antioxidante deste composto, tem sido relacionado com a sua ação neuroprotetora (CHOI *et al.*, 2002; QIAO *et al.*, 2005).

Os quatro hidrogênios fenólicos (**Figura 7**) justificam sua habilidade em modular o sequestro de radicais livres em combinação com as duas porções catecol que



providenciam uma polaridade adequada para que o AR penetre bicamadas lipídicas (GIL; ENACHE; OLIVEIRA-BRETT, 2013; FADEL; EL; MORANDAT, 2013). Investigações eletroquímicas revelam que o primeiro passo na oxidação desse composto está associado com a porção do ácido cafeico, e o segundo passo corresponde a oxidação do resíduo do ácido 3,4-dihidroxifenil láctico, devido a essas combinações estruturais, o potencial antioxidante do AR é maior que dos outros derivados do ácido hidroxicinâmicos.

**Figura 7** - Fórmula molecular do Ácido Rosmarínico ( $C_{18}H_{16}O_8$ ).



Fonte: Sigma Aldrich, 2016.

Alguns estudos sugerem que o AR possa apresentar um potencial efeito antioxidante, o que motiva a um crescente interesse em estudar seu efeito neuroprotetor em modelos de doenças neurodegenerativas associadas à produção de espécies reativas de oxigênio (ALKAM *et al.*, 2007; SHIMOJO *et al.*, 2010). O AR já apresentou em estudo prévio possuir uma capacidade protetora contra os efeitos de estresse oxidativo induzido pelo peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), em um modelo de células dopaminérgicas humanas (SH-SY5Y). Neste estudo o AR impediu a morte dessas células (LEE *et al.*, 2008).

Estudos mostraram que a administração oral do AR (10 mg/kg) por 21 dias reduziu significativamente a peroxidação lipídica em múltiplas áreas do cérebro em ratos diabéticos, juntos com a modulação da neurotransmissão colinérgica. Em doses maiores que 50 mg/kg, AR produz efeito anti-inflamatório significativo em ratos submetidos a modelo experimental diabético de isquemia (MUSHTAQ *et al.*, 2014).

O AR também apresenta importante efeito anticolinesterásico observado em ensaios *in vitro*, resultados importantes para explicar o efeito da melhora dos distúrbios de memória (DASTMALCHI *et al.*, 2008). Além disso, estudos têm relatado um potencial efeito anti-inflamatório do AR em diferentes modelos animais envolvendo neurodegeneração e neuroinflamação e as principais propriedades anti-inflamatórias desse metabólito foram analisadas através da sua capacidade de bloquear a fixação do sistema complemento, principal mediador humoral do processo inflamatório junto aos anticorpos, e inibição das lipooxigenases e ciclooxigenases (KIMURA; OKUDA; OKUDA, 1987; SAHU; RAWAL; PANGBURN, 1999; KELM; NAIR; STRASBURG, 2000).

Apesar da carência de estudos envolvendo indícios de que o tratamento com AR possa estar associado com uma melhora em alterações neuroquímicas no TEPT, uma pesquisa apontou uma melhora da proliferação celular hipocampal e aumento da expressão de ERK1/2 fosforilada (pERK1/2), envolvida na sinalização de cinase de proteína cinase ativada por mitógeno (via MAPK/ERK), responsável pela ativação transcricional e na síntese subsequente de proteínas implicadas na sobrevivência neuronal e neuroplasticidade na depressão (EINAT *et al.* 2003; HAYLEY *et al.* 2005). Tal estudo proveu evidências preliminares para justificar o uso do AR no TEPT, sendo necessário maior investigação para elucidar detalhadamente a cascata de sinalização envolvendo a fisiopatologia de desordens relacionadas ao distresse traumático para confirmar a eficácia do AR como um possível tratamento no TEPT (JIN e LIU *et al.* 2013).

Variados estudos têm avaliado a eficácia do AR no tratamento de diversas patologias, apresentando efeitos biológicos em modelos *in vitro* e *in vivo*, principalmente sua capacidade antioxidante e antiinflamatória. Em um deles foi utilizada a forma *spray*, como analgesia adjuvante no tratamento de dor central em pacientes com esclerose múltipla. Em outro estudo foi utilizada forma inalatória, em pacientes com dor neuropática pós-traumática ou pós-cirúrgica, com melhora na intensidade da dor. E mais recente foi observado melhora dos sintomas tipo TEPT induzidos por estresse traumático em modelo animal de TEPT utilizando-se o ácido rosmarínico (NIE, PENG e LAO *et al.* 2014).

Por se tratar de um tratamento do tipo SFBR (Simples, Fácil, Barato e Racional) em oposição a tratamentos dispendiosos, tóxicos e custosos, o ácido rosmarínico pode ser uma opção para casos de doenças neuroinflamatórias potencialmente refratárias como o TEPT, em falhas terapêuticas ou eficácia insuficiente.

### 3 JUSTIFICATIVA

O TEPT apesar de já descrito por Charcot e Freud há algum tempo, sua definição e características da forma como entendemos hoje ainda são recentes. Somado a isso temos seu mecanismo fisiopatológico ainda escasso de elucidação, fato esse que prejudica o desenvolvimento de novos fármacos e terapias alvo para o seu tratamento, tal característica é um fator limitante na prática clínica multi e interdisciplinar.

A terapia farmacológica disponível na atualidade possui alto índice de resistência, refratariedade, recidivas e efeitos colaterais, interferindo diretamente na adesão ao tratamento por parte dos pacientes, além de frustração dos profissionais envolvidos, conflitos familiares e risco social que promovem o surgimento de novas formas de preconceito social como a psicofobia - preconceito contra as pessoas que sofrem de transtornos e deficiências mentais (KELMENDI, 2016).

Existem apenas dois fármacos aprovados pela agência federal americana de alimentos e fármacos (FDA ou USFDA) para o tratamento de TEPT, paroxetina e sertralina, os quais raramente produzem uma taxa de resposta superior a 60%, e menos de 30% dos pacientes apresentam remissão clínica (BERGER *et al.*, 2009). Estudos apontam que os medicamentos para TEPT não obtiveram melhor desempenho do que o placebo em ensaios clínicos (CIPRIANI *et al.*, 2017; HERTZBERG *et al.*, 2000). Eles são, no entanto, curiosamente tão semelhantes em sua eficácia na terapêutica clínica quanto os medicamentos antidepressivos utilizados para depressão em comparação com placebo (LEUCHT *et al.*, 2012).

Aliado a isso temos o crescente interesse no uso de terapias com produtos naturais, principalmente com substâncias ativas derivadas de plantas (RATES, 2001). As plantas são fontes altamente ricas em componentes antioxidantes, em grande parte derivados de compostos fenólicos (AHER *et al.*, 2011; ZHENG e WANG, 2001), tal como o AR.

O AR é um composto altamente versátil e com boa viabilidade econômica, pois sua molécula pode ser derivada de produtos naturais ou sintetizado artificialmente, além

de possuir boa segurança farmacológica, uma vez toxicidade só de apresenta em dose superior a 2 g/kg (BORGES, 2015). Tais características promissoras apontam o AR como potencial alvo farmacoterapêutico, classificando-o para estudos em modelos pré-clínico de enfermidades neurológicas como o TEPT, passo fundamental que antecede aos ensaios clínicos em humanos.

Dessa forma, esse trabalho tem o intuito de ampliar o conhecimento do potencial neuroprotetor do AR por meio de avaliações comportamentais, bioquímicas e farmacológica para o tratamento de TEPT, uma desordem neuropsiquiátrica devastadora, ligada a profundo comprometimento mental, físico, ocupacional e funcional. Além disso, sociedades arcam com grande impacto socioeconômico, tendo em vista sua elevada incidência e constante aumentado global (VOGT *et al.*, 2017).

## 4 OBJETIVO

### 4.1 OBJETIVO GERAL

- Avaliar o potencial efeito neuroprotetor do AR em um modelo pré-clínico de transtorno de estresse pós-traumático em camundongos, por meio de parâmetros comportamentais, bioquímicos e farmacológico.

### 4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estabelecer uma curva dose-resposta de AR no modelo de TEPT;
- Avaliar o efeito do AR no comportamento de medo e tipo ansiedade através de etograma;
- Avaliar o efeito da sertralina (controle positivo) no comportamento de medo e tipo ansiedade através de etograma;
- Avaliar o efeito do AR e da sertralina sobre o aprendizado e memória dos animais;
- Quantificar a concentração de corticosterona no plasma dos animais tratados com AR e sertralina após indução do TEPT;
- Quantificar a expressão de fatores neurotróficos BDNF e GDNF na região hipocampal dos animais tratados com AR no modelo de TEPT através de imunoblot.

## 5 MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.1 ANIMAIS

Foram utilizados camundongos Swiss machos e fêmeas com 8 semanas de idade, pesando aproximadamente 40 g, sob ciclo claro-escuro 12:12h (HEINE, 1998), e temperatura controlada de  $24^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , com água e ração *ad libitum*. Os animais foram alojados em nosso próprio biotério no Laboratório de Neurobiologia Molecular e Comportamental (LNMC) / Laboratório de Neurobiologia da Dor e Inflamação (LANDI) da UFES / UFSC, foram mantidos em caixas de polipropileno (38cm x 20cm x 13cm) com piso coberto com serragem e limpos duas vezes por semana sempre pelo mesmo pesquisador até o final dos experimentos. Todos os animais foram recebidos do Biotério Central do Centro de Ciências da Saúde (CCS) / Centro de Ciências Biológicas (CCB) da UFES / UFSC após desmame realizado entre 21 a 30 dias de vida e mantidos em gaiolas com no máximo 5 animais em hacks com microisoladores no biotério/casa de passagem dos respectivos laboratórios.

Foram respeitados os princípios éticos do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), que estão de acordo com as normas internacionais de pesquisa envolvendo animais. Os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Uso Animal (CEUA) da Universidade Federal do Espírito Santo (protocolo nº 18/2017) e cumpriram a Diretiva UE 2010/63 / UE sobre a proteção de animais utilizados para fins científicos (<https://eur-lex.europa.eu/eli/dir/2010/63/oj>).

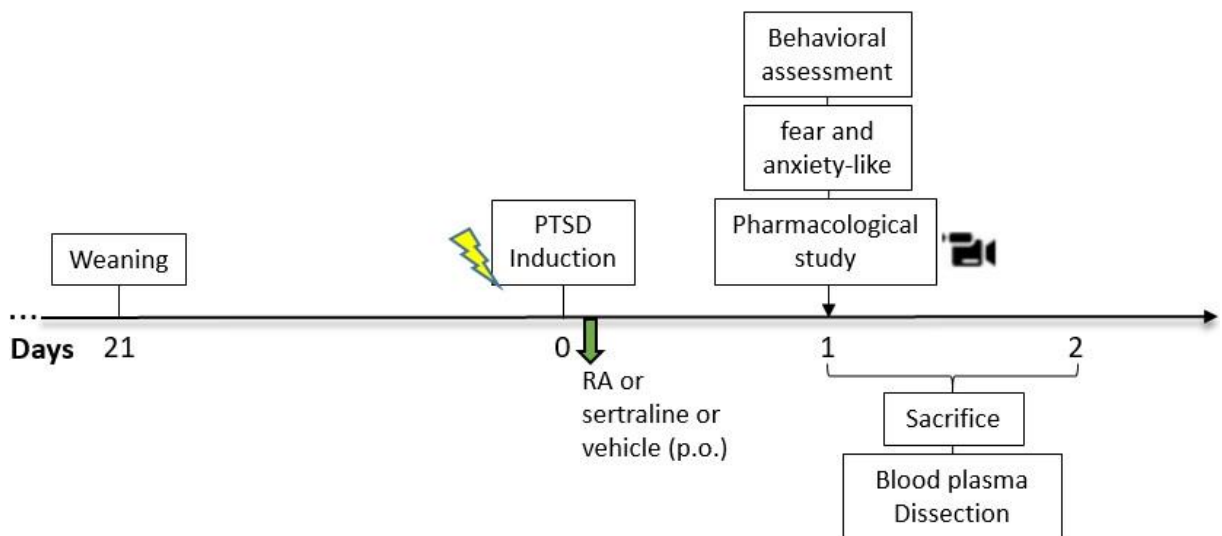
### 5.2. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Um modelo de choque inescapável nas patas adaptado de Pynnos e colaboradores (1996), conforme previamente descrito (CERUTTI, 2014; BARROS, 2016) foi utilizado. O modelo de TEPT consistiu de uma breve ambientação de 30 segundos dos animais ao aparato *step down* modificado (impedindo a fuga para a plataforma), após foi aplicado choques nas patas dos animais. Um total de cinco ciclos de choques elétricos com intensidade de 0,8 mA e duração de 10 s com 30 s de intervalo entre cada estimulação elétrica. A indução de TEPT foi registrada em

câmera de ultra definição (UHD) e captura de 30 quadros por segundo (FPS) (Logitech, USA) e os estímulos etológicos de tentativas de fuga (corridas e saltos), vocalização, micção e defecação observada individualmente assegurando a indução do modelo.

As drogas (AR e sertralina) foram dissolvidas em solução salina (NaCl 0,9%) contendo 5% de dimetilssulfóxido (DMSO). O tratamento foi realizado 30 minutos após o evento traumático por meio da administração intragástrica (i.g.) via gavagem. Os animais do grupo controle negativo (C) foram administrados somente com veículo (10 ml/kg), utilizado para diluir o AR e sertralina. O AR (obtido da Sigma-Aldrich, CAS 20283-92-5) foi administrado nas doses de 3, 10, 30 e 100 mg/kg, enquanto que a dose utilizada de sertralina foi de 15 e 30 mg/kg.

**Figura 8** - Delineamento experimental.



Legenda: Camundongos Swiss machos (n = 183) e fêmeas (n = 68) desmamados entre 21 e 30 dias de idade foram obtidos e divididos em grupos experimentais até completarem oito semanas de idade, quando foram submetidos a um modelo animal de Transtorno de Estresse Pós-Traumático por meio de choque inescapável nas patas, utilizando um aparelho *step down* modificado. AR, sertralina ou veículo foram administrados i.g. 30 minutos após a indução do trauma. Os animais foram reexpostos ao aparato 24h após o evento traumático com o intuito de evocar a memória aversiva, e assim, analisar características comportamentais relacionadas ao medo e ansiedade em um paradigma de etograma e no LCE. O plasma sanguíneo foi coletado para análise de corticosterona 24 ou 48 horas após indução do trauma. O encéfalo foi dissecado e o hipocampo armazenado em ultrafreezer -80°C. Ao final, foi realizada análise estatística dos dados e os resultados expressos em valores da média  $\pm$  erro padrão da média.



Os animais foram divididos aleatoriamente em grupos independentes de acordo com a administração das respectivas doses e drogas:

(C): grupo controle negativo / veículo 10 ml/kg;

(V): grupo PTSD / veículo 10 ml/kg;

(3): grupo PTSD / AR 3 mg/kg;

(10): grupo PTSD / AR 10 mg/kg;

(30): grupo PTSD / AR 30 mg/kg;

(100): grupo PTSD / AR 100 mg/kg;

(15): grupo PTSD / sertralina 15 mg/kg;

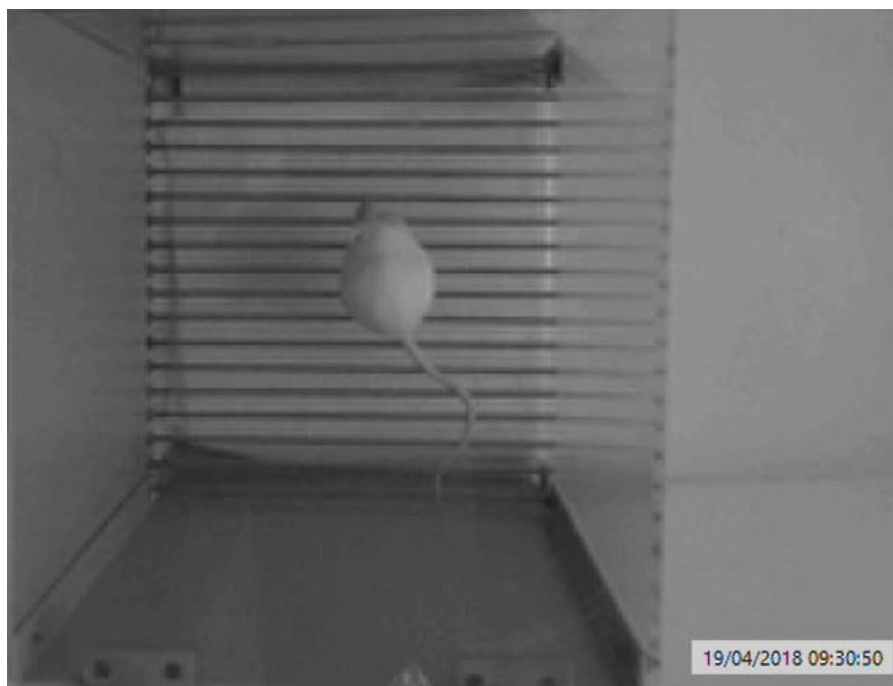
(30): grupo PTSD / sertralina 30 mg/kg.

Os animais controle apesar de não submetidos à indução de trauma, foram colocados e mantidos no aparato pelo mesmo tempo que os animais que receberam a indução do TEPT. Não foi utilizado grupo naive, pois já foi observado previamente que não existe diferença nas respostas comportamentais e bioquímicas deste grupo em relação aos animais do grupo controle negativo (CERUTTI, 2014; BARROS, 2016).

### 5.3. AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL

A análise do comportamento de medo e ansiedade foi realizada 24h após a indução do TEPT. Os animais foram habituados à sala do experimento por 2 horas e, em seguida, colocados no aparato *step down* modificado para camundongos (28 x 23 x 26cm) (Insight®, Ribeirão Preto, SP), onde foram mantidos por 3 minutos. A caixa foi limpa com álcool a 70% entre as exposições de cada animal. Toda a atividade locomotora foi registrada por câmera UHD e monitorada pelo software Anymaze® e os aspectos comportamentais do tipo medo e ansiedade foram gravados para posterior avaliação por pesquisador cego.

**Figura 9** - Aparato *step down* modificado para camundongos.



Fonte: Arquivo pessoal, 2018.

### **5.3.1. Congelamento (*freezing*)**

O comportamento de congelamento é caracterizado como um comportamento de imobilidade total, excluindo-se movimentos mínimos inerentes a respiração e espasmos involuntários. É um estado de imobilidade defensiva do organismo que se mostra passivo, porém ativamente preparado para responder a estímulos subsequentes (VALENTE et al., 2008).

No contexto de evocação do medo pela memória aversiva do evento traumático, o período de congelamento dos animais submetidos a modelos de TEPT tem sido utilizado como parâmetro mais fidedigno para mensurar uma resposta de medo exagerado (SZCZYTKOWSKI, LEBONVILLE e LYSLE, 2012).

O *freezing* refere-se a uma resposta de medo intensa, na qual o animal, baseado em experiências anteriores, responde de forma defensiva e intensa ao ambiente, quando reexposto a ele (BALI, JAGGI, 2015). Os camundongos foram submetidos ao modelo de indução de TEPT e 24h após foram reexpostos por três minutos ao aparato gerador de choques, ambas as etapas foram realizadas sob filmagem para

posterior avaliação de um pesquisador cego. O tempo de freezing foi medido e a contagem era interrompida ao apresentar algum tipo de movimentação pelo animal e reiniciada quando o mesmo retornasse ao estado de imobilidade.

### **5.3.2. Locomoção**

Contrário à imobilidade o tempo de locomoção ou movimentação total corresponde ao tempo em que o animal se movimentou no aparato e foi quantificado subtraindo-se o tempo de exploração total de três minutos pelo tempo de freezing cronometrado.

### **5.3.3. Latência de movimento**

A reação de freezing é associada tanto ao medo, que é a reação a uma ameaça real e identificada de forma iminente ou a ansiedade, relacionada a sensação ou sugestão de ameaça futura. Animais que recebem choque nas patas, geralmente permanecem imóveis ou movimentam-se ou locomovem-se pouco quando reexpostos ao aparato. Em outros testes como Labirinto em Cruz Elevado, Caixa Claro/Escuro e Teste do Nado Forçado, a latência dos animais em apresentar o comportamento analisado também pode ser avaliada. Em vista disso, o presente trabalho também avaliou a latência dos animais em sair pela primeira vez do estado de *freezing* e se movimentar no aparato. A latência de movimento foi cronometrada do momento que o animal foi colocado dentro do aparato até o momento que saiu pela primeira vez do estado de freezing.

### **5.3.4. Exploração vertical (*rearing/climbing*)**

O número de explorações verticais (*rearing*) ou explorações verticais com apoio das patas dianteiras (*climbing*) executadas pelos animais submetidos ao modelo em comparação aos demais grupos experimentais foi contabilizado no momento de reexposição de 3 minutos. Tal ação exploratória é comum e considerada uma variável de avaliação motora e de ansiedade (POLESEL *et al.*, 2014).

### 5.3.5. Grooming

A autolimpeza (autocuidado) também é uma ação comumente vista em roedores e a mensuração deste comportamento foi realizada sabendo-se que as correlações existentes entre comportamentos tipo ansioso e a execução do grooming em camundongos são influenciadas pelo distresse (KALUEFF *et al.*, 2016). A medida do tempo total de ocorrência do grooming foi cronometrada.

### 5.3.6. Defecação

Outro sinal de medo em roedores é aumento da defecação quando reexposto a estímulos indutores de distresse (LESTER, 1968; STAM *et al.*, 1995; GAO *et al.*, 2011). O aumento da defecação (motilidade do cólon) é uma medida altamente sensível ao estresse psicológico em ratos (VERLEYE e GILLARDIN, 2004). Por isso o número de bolus fecais foi contabilizado no momento da reexposição por três minutos de cada animal.

## 5.4. LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO

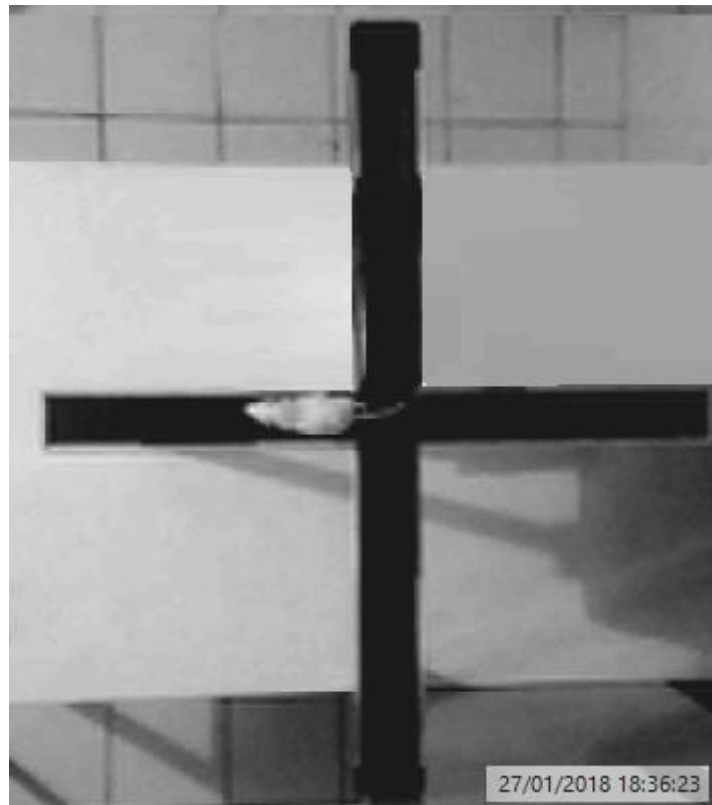
Imediatamente após a reexposição dos camundongos ao aparato *step down*, os animais foram colocados individualmente no centro de um labirinto em cruz elevado (LCE) e deixados explorar livremente por 5 minutos. Cada braço mede 25 x 5 cm (comprimento x largura) e é elevado a 50 cm de distância da superfície. O aparato é constituído por 2 braços abertos com “corrimão” de segurança de 1 cm de altura em acrílico transparente e 2 braços fechados com acrílico de cor preta (30 cm de altura). Entre cada exposição individual dos animais o aparato foi limpo com álcool etílico a 70% e água destilada.

O número de entradas nos braços fechados e nos braços abertos foi mensurado, onde também foi medido o tempo total gasto nos braços fechados e nos braços abertos, bem como a quantidade de cruzamentos e tempo de permanência na zona neutra (dados não mostrados). Animais que sofreram queda do aparato durante o teste foram eliminados do experimento, bem como, os animais que apresentaram

congelamento durante exploração nos braços abertos impossibilitando a viabilidade do teste.

A atividade locomotora foi registrada por câmera UHD, o efeito ansiolítico do AR foi analisado a partir do tempo de permanência dos animais nos braços abertos.

**Figura 10** - Labirinto em cruz elevado para camundongos.



Fonte: Arquivo pessoal, 2018.

### 5.5. ESQUIVA INIBITÓRIA NO APARATO *STEP DOWN*

O teste de esQUIVA inibitória ou esQUIVA passiva foi desenvolvido no contexto de condicionamento Pavloviano, utilizando um aparato eletrificado (*step down*) que permite a associação a um ambiente inicialmente não aversivo e seguido de um choque elétrico, criando assim uma resposta condicionada, ligada ao aprendizado de uma tarefa aversiva (GOLD *et al.*, 1986). É um teste amplamente utilizado em avaliações de memória aversiva (medo), na avaliação de drogas com efeitos

amnésicos ou com ação sobre a memória no âmbito de estudos farmacológicos no desenvolvimento de fármacos (SOARES *et al.*, 2011).

Com o objetivo de avaliar se os tratamentos com AR ou sertralina afetam o aprendizado e memória, utilizou-se o paradigma da esQUIVA INIBITÓRIA no aparato *step down*. Os animais foram colocados na plataforma elevada e o tempo para sair totalmente da plataforma para as barras eletrificadas com as quatro patas foi medido. Após esse tempo, aplicou-se estímulo elétrico sub-traumático (0,5 mA por 5 segundos), durante a fase de treinamento o tempo está relacionado à aquisição da aprendizagem inibitória (SOARES *et al.*, 2011).

Grupos distintos de animais foram tratados pela via i.g. com AR (30 mg/kg), sertralina (30 mg/kg), ou veículo (10 ml/kg) 30 minutos após a aplicação do estímulo elétrico nas patas. Após 24 horas os animais foram colocados novamente sobre plataforma, sendo medido o tempo gasto para os animais descerem totalmente a plataforma com as quatro patas (SOARES *et al.*, 2011).

Nesse experimento, foram utilizados os seguintes grupos:

- (1): choque / veículo 10 ml/kg;
- (2): choque / RA 30 mg/kg;
- (3): choque / sertralina 30 mg/kg.

## 5.6. COLETA DE SANGUE, OBTENÇÃO DE PLASMA SANGUÍNEO E DISSECÇÃO CEREBRAL

A coleta de sangue foi realizada após a eutanásia por decaptação dos animais, as amostras de sangue foram rapidamente colhidas diretamente em tubos de 1,5 ml contendo solução anticoagulante (1:10 v/v) de citrato de sódio 3,2% (m/v) em água deionizada. O sangue coletado foi imediatamente centrifugado por 10 minutos a velocidade de 2.400 g na temperatura de 4 °C, sendo armazenado a -80 para posterior análise.

O encéfalo foi rapidamente dissecado e as regiões do hipocampo, estriado, córtex pré-frontal e tronco encefálico foram imediatamente congeladas em gelo seco e armazenados a  $-80^{\circ}\text{C}$  até posterior análise.

#### 5.7. PROCESSAMENTO E QUANTIFICAÇÃO DE CORTICOSTERONA PLASMÁTICA POR HPLC ACOPLADO A DETECTOR UV-VIS

A corticosterona foi extraída de amostras de plasma de acordo com o método descrito anteriormente (VELAZQUEZ-MOCTEZUMA, 2002; WOODWARD and EMERY, 1987). Para tal, 300  $\mu\text{l}$  de plasma foi adicionado a 1,5 ml de uma mistura de éter etílico (Sigma-Aldrich) e diclorometano (Vetec) (60:40, v/v) e posteriormente foi agitado com o auxílio de um vortex por 30 s. Após, a solução resultante foi imediatamente centrifugada a 600 g por 5 min. O sobrenadante (1 ml) foi então transferido para um segundo tubo e adicionado 300  $\mu\text{l}$  de água tipo 1 ou grau HPLC (Cromatografia Líquida de Alta Resolução) e após foi agitado em vortex durante 30 s e posteriormente centrifugado a 600 g por 5 min. Finalmente, após a centrifugação cerca de 1 ml do sobrenadante foi cuidadosamente evaporado com nitrogênio gasoso e o resíduo resultante foi reconstituído com 100  $\mu\text{l}$  de uma mistura de metanol (Sigma-Aldrich) e água ultrapura (55:45 v/v).

A amostra (20  $\mu\text{L}$ ) foi injetada em HPLC acoplado a detector ultravioleta-visível (UV-Vis) usando uma coluna de fase reversa (Shimadzu Shim-pack "CLC (M)" 4,6 mm id x 15cm, 5  $\mu\text{m}$ ) com um fluxo cromatográfico de 0,4 ml/min e temperatura do forno constante de  $40^{\circ}\text{C}$ . A fase móvel constituída de uma solução de acetonitrila (Sigma-Aldrich) em água grau HPLC, na proporção de 65:35 v/v, devidamente filtrada a vácuo com membrana de PVDF de 0,22  $\mu\text{m}$  (Aprolab).

#### 5.8. QUANTIFICAÇÃO PROTEICA DOS FATORES NEUROTROFICOS BDNF E GDNF NO HIPOCAMPO POR IMUNOBLLOT

Amostras de hipocampo armazenadas previamente em freezer a  $-80^{\circ}\text{C}$  foram homogeneizadas em tampão de lise RIPA [Tris-HCl (10 mM), NaCl (150 mM), EDTA

(1 mM), Triton X-100 (1%), pH 7,4 NaOH (0,5 M) e um coquetel de inibidor de protease (diluição de 1:100) (Sigma-Aldrich)] e mantidos durante 30 min em gelo. Após, a amostra foi centrifugada a 12.000 g a 4 °C por 30 min, a quantificação das proteínas totais nas amostras foi realizada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976). As amostras foram diluídas num tampão de amostra 5x (10% SDS, 500 mM 2-mercaptoetanol, 50% Glycerol, 250 mM Tris-HCL and 0.5% bromophenol blue dye, pH 6,8) e aquecidas a 100 °C por 5 min. Em seguida, 20 µl das amostras foram submetidos à separação por electroforese utilizando método de eletroforese em gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), do inglês *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) a 4-12%. As membranas de pvdf contendo as proteínas transferidas foram bloqueadas com leite em pó-desnatado a 5% com TBS-T [Tris base (24,2 g), NaCl (50 g) e H<sub>2</sub>O destilada, ajustado pH 7,6 com solução de HCl 5M, filtrado e mantido ao abrigo da luz e em geladeira (4° C)]. Depois disto, incubou-se com os anticorpos primários: anti-BDNF ([1: 1000] coelho, Alomone); anti-GDNF ([1: 1000] coelho, Alomone, CO, EUA) e β-actina ([1: 1000] camundongo, Santa Cruz, Inc., EUA) por 18 h e as membranas foram lavadas 3x de 10 minutos cada com TBS-T e posteriormente incubadas com os respectivos anticorpos secundários (anti coelho ou anti-camundongo) conjugados com peroxidase ([1:5000], Abcam, Inc., USA). Para detecção por quimiluminescência, as membranas foram incubadas com 250 µl (1:1) de Reagente ECL (GE Healthcare, Freiburg, DE) e as imagens foram adquiridas no sistema de imagem ChemiDoc™ XRS+ (Bio-Rad). Os sinais de imunotransferência foram quantificados usando o software Image Lab™ 5.2.1 (Bio-Rad) e os níveis de expressão de proteínas foram normalizados para a expressão de β-actina.

## 5.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados são apresentados em média ± erro padrão da média (EPM) para cada grupo. Os dados comportamentais e bioquímicos foram analisados usando análise de variância (ANOVA) de uma via ou duas vias, seguida de correção de múltiplas comparações, *post hoc* de Bonferroni (BONFERRONI, 1936).



Os valores de  $p$  foram considerados como indicativos de significância quando menores ou igual a 0,05 ( $p \leq 0,05$ ). Os outliers foram cuidadosamente removidos pelo teste de Grubb ou método de desvio estudantil extremo (ESD) (do inglês *extreme studentized deviate*) para  $p \leq 0,05$  (GRUBBS, 1969). As análises foram realizadas com o software estatístico GraphPad Prism v7.0 (GraphPad Software, Califórnia, EUA).

## 6 RESULTADOS

### 6.1 AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL

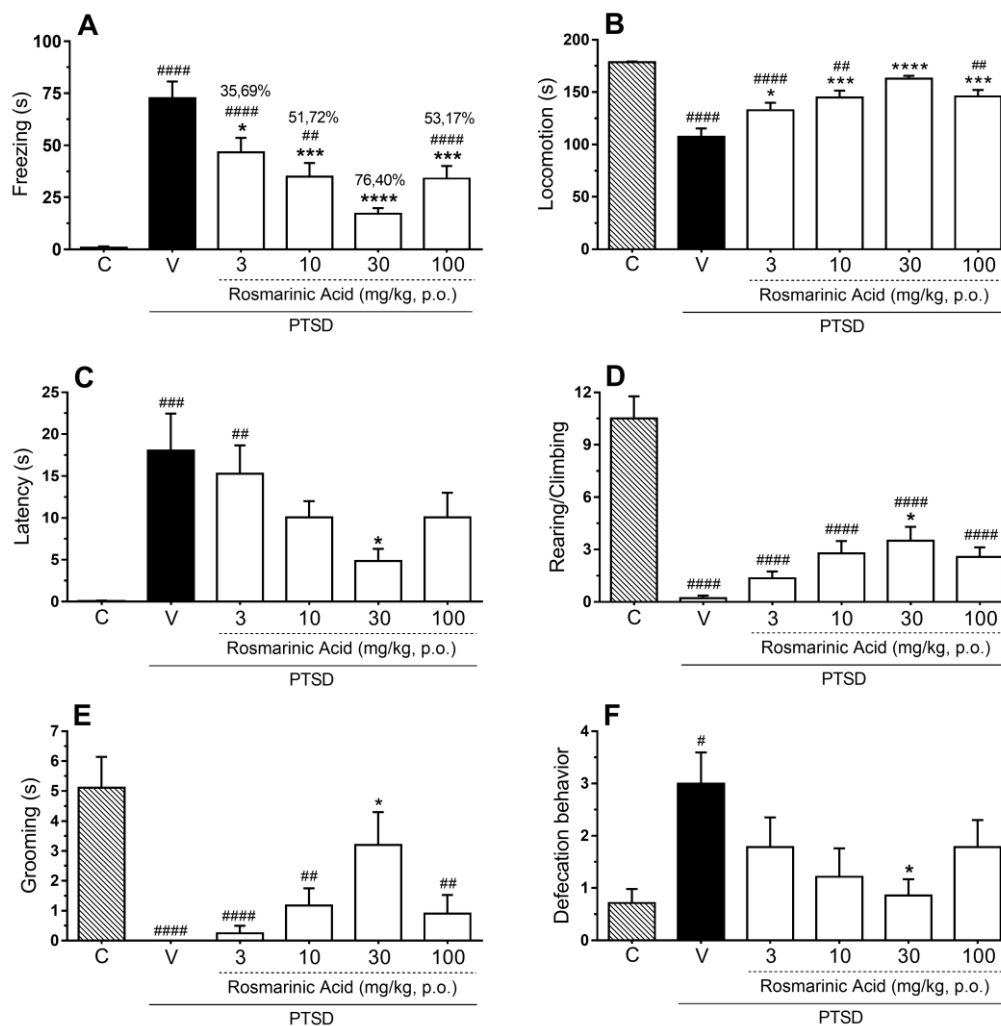
Com o objetivo de avaliar o efeito neuroprotetor do AR e seu potencial na redução das alterações emocionais e comportamentais associadas ao TEPT, os camundongos foram reexpostos por 3 minutos no aparato *step down* 24h após indução do TEPT.

Como mostrado na **Fig. 11**, os animais submetidos ao TEPT e tratados com veículo apresentaram aumento do tempo de congelamento (*freezing*) [ $F(5, 78) = 18,36, p \leq 0,0001$ ] (**Fig. 11A**), diminuição da locomoção total [ $F(5, 78) = 17,92, p \leq 0,0001$ ] (**Fig. 11B**), e aumento na latência de primeiro congelamento (*freezing*) [ $F(5, 77) = 5,727, p = 0,0168$ ] (**Fig. 11C**) e também aumento no comportamento de defecação (*bolus feacalis*) [ $F(5, 78) = 2.994, p = 0,0367$ ] (**Fig. 11F**) quando comparado com o grupo controle negativo (C).

Além disto, também foi observado que os animais com TEPT/veículo apresentaram respostas comportamentais relacionadas ao comportamento semelhante à ansiedade, como redução na exploração vertical ou *rearing/climbing* [ $F(5, 78) = 24,25, p = 0,0343$ ] (**Fig. 11D**), assim como, redução no comportamento de autolimpeza ou *grooming* [ $F(5, 78) = 7,816, p = 0,0319$ ] (**Fig. 11E**), ambas respostas diminuídas em relação ao grupo controle negativo (C).

Curiosamente, a dose de 30 mg/kg de AR foi a mais efetiva em reduzir os sintomas de medo e ansiedade associado ao TEPT, como evidenciado pela diferença estatística entre o grupo TEPT/veículo e TEPT/AR 30 mg/kg. Por outro lado, os animais tratados com a dose de 100 mg/kg de AR apresentaram redução da resposta quando comparados com o grupo AR 30 mg/kg dos parâmetros do etograma. Tal fato, permite inferir que doses > 100 mg/kg do AR seriam menos eficazes, caracterizando um perfil de resposta em formato de U.

**Figura 11** - Efeito dependente da dose do AR no comportamento de camundongos machos submetidos ao modelo de TEPT.



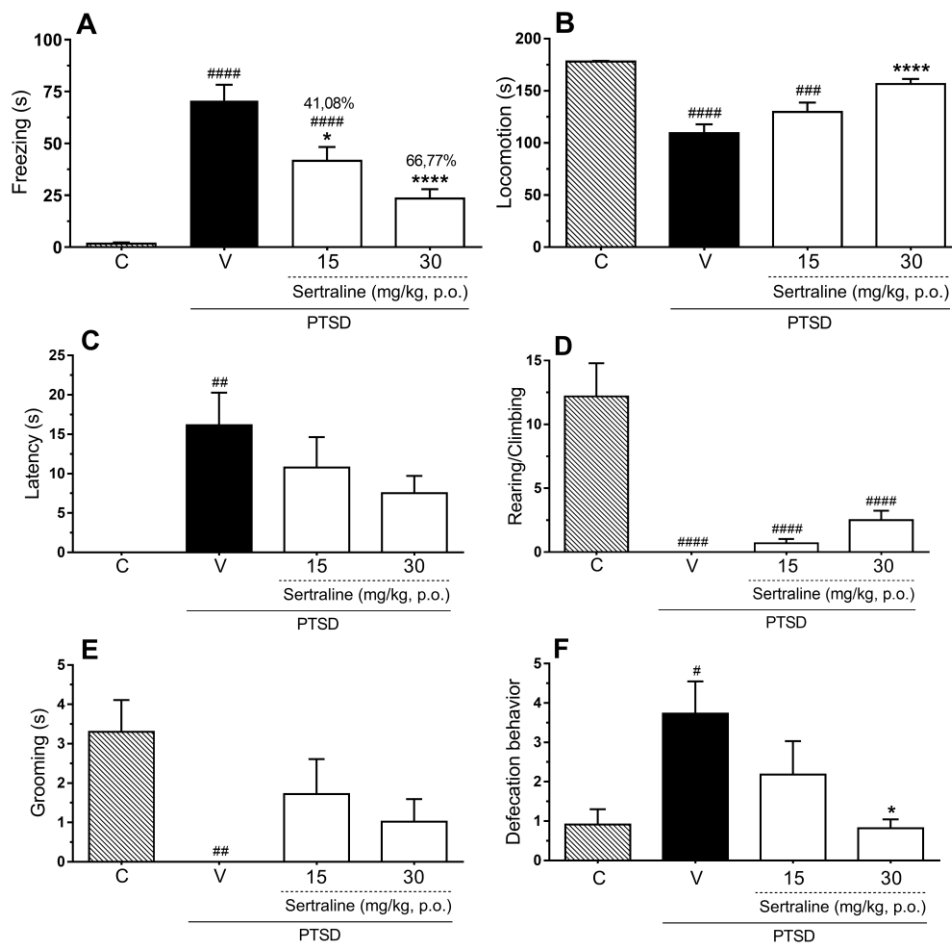
Legenda: Avaliação da resposta dependente da dose do AR no comportamento de camundongos machos submetidos ao modelo de TEPT. As respostas comportamentais observadas foram *freezing* ou congelamento (A); locomoção total (B); latência de primeiro *freezing* (C); exploração vertical ou *rearing/climbing* (D); autolimpeza ou *grooming* (E) e defecação (F). Cada coluna representa a média de 14 animais e as linhas verticais indicam o EPM. Os símbolos mostram significância estatística por meio da ANOVA de uma via seguida pelo pós-teste de Bonferroni. #####  $p \leq 0,0001$ , ###  $p \leq 0,01$  comparado ao grupo controle/veículo (C) e \*\*\*\*  $p \leq 0,0001$ , \*\*\*  $p \leq 0,001$ , \*  $p \leq 0,05$  comparado ao grupo TEPT/veículo (V).

Os dados apresentados na **Fig. 12** mostram que a sertralina, usada como controle positivo, promoveu redução da resposta emocional relacionada ao medo e no comportamento semelhante à ansiedade de camundongos submetidos ao TEPT.

Os animais tratados com a sertralina apresentaram redução dependente da dose dos comportamentos de medo como *freezing* ou congelamento [ $F_{(3, 40)} = 27,58$ ,  $p \leq 0,0001$ ] (**Fig. 12A**), aumento na locomoção total [ $F_{(3, 36)} = 20,38$ ,  $p \leq 0,0001$ ] (**Fig. 12B**) e atenuação no comportamento de defecação [ $F_{(3, 40)} = 4,632$ ,  $p = 0,0141$ ] (**Fig. 12F**), exceto no comportamento de latência de primeiro *freezing* ou congelamento [ $F_{(3, 36)} = 4,925$ ,  $p = 0,3198$ ] (**Fig. 12C**) quando comparado com o grupo TEPT.

Além disto, foi observado que a sertralina não foi capaz de promover mudanças nos comportamentos indicativos de comportamento de ansiedade, como exploração vertical ou *rearing/climbing* [ $F_{(3, 36)} = 17,4$ ,  $p > 0,9999$ ] (**Fig. 12D**) e autolimpeza ou *grooming* [ $F_{(3, 36)} = 4,342$ ,  $p > 0,9999$ ] (**Fig. 12E**) em relação ao grupo TEPT.

**Figura 12** - Efeito dependente da dose da sertralina no comportamento de camundongos machos submetidos ao modelo de TEPT.



Legenda: Avaliação da resposta dependente da dose da sertralina no comportamento emocional (etograma) de camundongos machos submetidos ao modelo de TEPT. As respostas comportamentais observadas foram *freezing* ou congelamento (**A**); locomoção total (**B**); latência de

primeiro *freezing* (C); exploração vertical ou *rearing/climbing* (D); autolimpeza ou *grooming* (E) e defecação (F). Cada coluna representa a média de 10/11 animais e as linhas verticais indicam o EPM. Os símbolos mostram significância estatística por meio da ANOVA de uma via seguida pelo pós-teste de Bonferroni. #####  $p \leq 0,0001$ , ###  $p \leq 0,001$ , ##  $p \leq 0,01$ , #  $p \leq 0,05$  comparado ao grupo controle/veículo (C) e \*\*\*\*  $p \leq 0,0001$ , \*  $p \leq 0,05$  em comparação com o grupo TEPT/veículo (V).

Em outro experimento foi verificado à posteriori se o efeito neuroprotetor do AR poderia estar associado ao sexo. Para tal, o efeito do AR sobre as alterações comportamentais foi investigado em camundongos fêmeas submetidas ao modelo de TEPT, conforme descrito anteriormente.

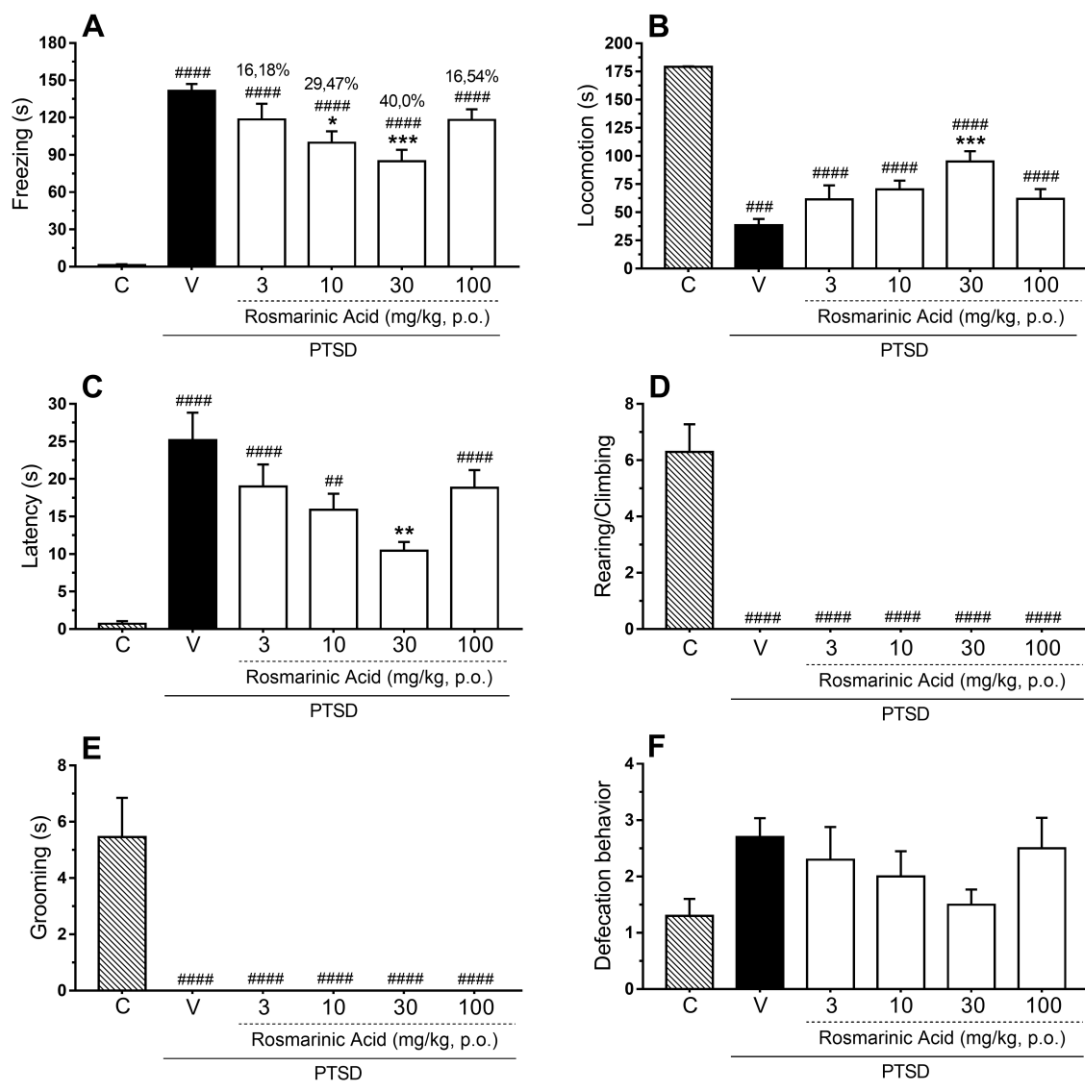
De forma semelhante, os camundongos fêmeas submetidos ao TEPT foram observados quando à presença de sinais fidedignos de indução do TEPT, como vocalização, micção, defecação e tentativa de fuga durante a indução da memória aversiva, e no momento de reexposição, durante a evocação da memória, apresentaram nítido comportamento de *freezing* ou congelamento. Os resultados apontam diferença estatística entre os grupos de fêmeas controle/veículo e TEPT/veículo, promovendo as alterações comportamentais tipo TEPT da mesma forma como exibido pelos dos camundongos machos.

Como mostrado na **Fig. 13**, os camundongos fêmeas submetidas ao TEPT e tratadas com AR apresentaram redução dependente da dose do comportamento de medo, como *freezing* ou congelamento [ $F_{(5, 78)} = 18,36$ ,  $p \leq 0,0001$ ] (**Fig. 13A**), aumento da locomoção total [ $F_{(5, 78)} = 17,92$ ,  $p \leq 0,0001$ ] (**Fig. 13B**), redução da latência de primeiro *freezing* [ $F_{(5, 77)} = 5,727$ ,  $p = 0,0168$ ] (**Fig. 13C**), e tendência de efeito positivo no comportamento de defecação com redução de *bolus feacalis* [ $F_{(5, 78)} = 2.994$ ,  $p = 0,0367$ ] (**Fig. 13F**) quando comparado com o grupo TEPT.

Entretanto, o AR não foi eficaz na resposta comportamental relacionada ao comportamento semelhante à ansiedade, como exploração vertical ou *rearing/climbing* [ $F_{(5, 78)} = 24,25$ ,  $p = 0,0343$ ] (**Fig. 13D**) e de autolimpeza ou *grooming* [ $F_{(5, 78)} = 7,816$ ,  $p = 0,0319$ ] (**Fig. 13E**) em relação ao grupo TEPT.

De forma convincente, o mesmo tratamento de dose com 30 mg/kg do AR impediu quase todos os sintomas de TEPT relacionados ao medo nas fêmeas como evidenciado pela diferença estatística entre o grupo TEPT/veículo (V) e TEPT/AR (30) nos parâmetros analisados, obtendo o mesmo perfil de resposta em formato de U dos camundongos machos. Logo o efeito do AR não é um fato isolado ligado ao sexo do animal, agindo em ambos os sexos.

**Figura 13** - Efeito dose dependente do AR no comportamento de camundongos fêmeas submetidas ao modelo de TEPT.

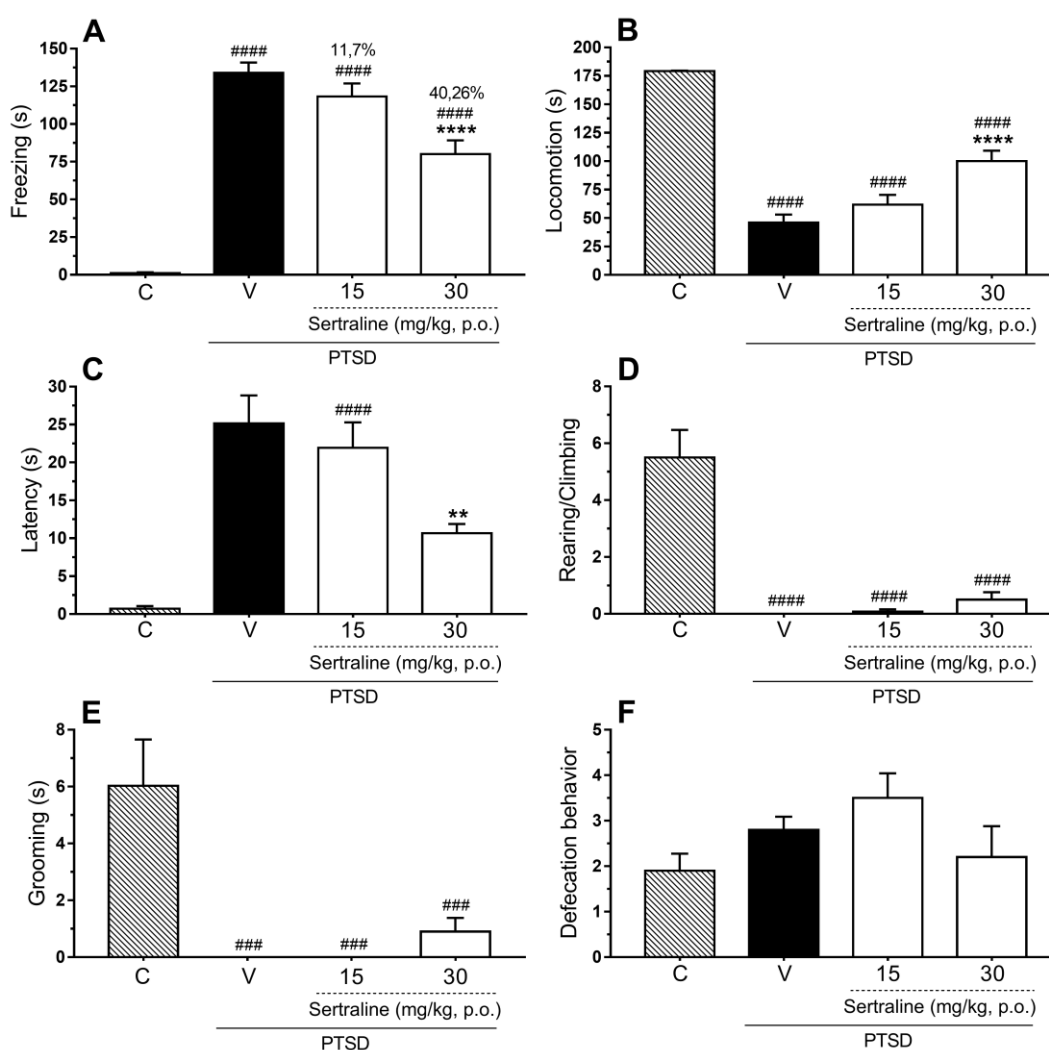


Legenda: Avaliação da resposta dependente da dose do AR no comportamento emocional (etograma) de camundongos fêmeas submetidas ao modelo de TEPT. As respostas comportamentais observadas foram *freezing* ou congelamento (**A**); locomoção total (**B**); latência de primeiro *freezing* (**C**); exploração vertical ou *rearing/climbing* (**D**); autolimpeza ou *grooming* (**E**) e defecação (**F**). Cada coluna representa a média de 10/12 animais e as linhas verticais indicam o EPM. Os símbolos mostram significância estatística por meio da ANOVA de uma via seguida pelo pós-teste de

Bonferroni. #####  $p \leq 0,0001$ , ###  $p \leq 0,001$ , ##  $p \leq 0,01$ , #  $p \leq 0,05$  em comparação com o grupo controle/veículo (C) e \*\*\*\*  $p \leq 0,0001$ , \*\*\*  $p \leq 0,001$ , \*  $p \leq 0,05$  comparado ao grupo TEPT/veículo (V).

A **Fig. 14** mostra a atividade emocional relacionada com o comportamento de medo e ansiedade dos camundongos fêmeas submetidas ao TEPT e tratamento com sertralina da mesma forma como realizado com os camundongos machos.

**Figura 14** - Efeito dose dependente da sertralina no comportamento de camundongos fêmeas submetidas ao modelo de TEPT.



Legenda: Avaliação da resposta dependente da dose da sertralina no comportamento emocional (etograma) de camundongos fêmeas submetidas ao modelo de TEPT. As respostas comportamentais observadas foram *freezing* ou congelamento (A); locomoção total (B); latência de primeiro *freezing* (C); exploração vertical ou *rearing/climbing* (D); autolimpeza ou *grooming* (E) e defecação (F). Cada coluna representa a média de 10/12 animais e as linhas verticais indicam o EPM. Os símbolos mostram significância estatística por meio da ANOVA de uma via seguida pelo pós-teste de Bonferroni. #####  $p \leq 0,0001$ , ###  $p \leq 0,001$  comparado com o grupo controle/veículo (C) e \*\*\*\*  $p \leq 0,0001$ , \*\*  $p \leq 0,01$  comparado ao grupo TEPT/veículo (V).

A avaliação dos parâmetros do etograma mostrou que os animais de todos os grupos não exibiram mudanças no comportamento inerente à ansiedade, como na exploração vertical ou *rearing/climbing* [ $F_{(3, 36)} = 17,4, p > 0,9999$ ] (**Fig. 14D**) e na autolimpeza ou *grooming* [ $F_{(3, 36)} = 4,342, p > 0,9999$ ] (**Fig. 14E**). No entanto, o tratamento com sertralina influenciou tanto nos comportamentos relacionados ao medo como redução do *freezing* ou congelamento [ $F_{(3, 40)} = 27,58, p \leq 0,0001$ ] (**Fig. 14A**), aumento da locomoção total [ $F_{(3, 36)} = 20,38, p \leq 0,0001$ ] (**Fig. 14B**) e redução na latência de primeiro *freezing* [ $F_{(3, 40)} = 4,632, p = 0,0141$ ] (**Fig. 14C**), exceto no comportamento de defecação [ $F_{(3, 36)} = 4,925, p = 0,3198$ ] (**Fig. 14F**). O perfil do experimento também mostrou uma curva dose-resposta em formato de U, equivalente ao alcançado pelos camundongos machos tratados com sertralina.

Curiosamente, em parâmetros em que o AR não surtiu efeito, a sertralina também foi incapaz de atuar, principalmente no envolvimento de comportamento semelhante à ansiedade. Isso nos indica que as regiões de controle das emoções (medo e ansiedade) apesar de compartilharem fisicamente tais centros encefálicos, participam de maneira diferenciada entre si no controle dessas emoções.

Em resumo (**Tabela 2**), os dados são indicativos de uma melhor eficácia no tratamento do TEPT com o AR em relação ao tratamento com a sertralina, visto que o AR foi capaz de reverter maior número de comportamentos ligados a atividade emocional dos animais submetidos ao modelo de TEPT e analisados pelo etograma tanto em camundongos machos como em fêmeas, surtindo efeito também de maneira mais eficaz, conforme pontuação máxima obtida (score total). Para elaboração da tabela foi atribuído 1 ponto (x) para valor significativamente estatístico, 0,5 ponto ( $\frac{1}{2}$ ) para tendência e zero ( $\emptyset$ ) para nenhum efeito.



**Tabela 2** - Resumo de efeitos dos tratamentos com AR e sertralina nos camundongos submetidos ao TEPT.

		Comportamentos						
		<i>Freezing</i>	Locomoção	Latência	Defecação	<i>Rearing/ Climbing</i>	<i>Grooming</i>	<i>Score total</i>
Machos	AR	x	x	x	x	x	x	6
		x	x	½	x	∅	∅	3,5
Fêmeas	Sertralina	x	x	x	½	∅	∅	3,5
		x	x	x	∅	∅	∅	3

Fonte: Elaborado pelo autor, 2019. Atribuído x = 1 para valor significativamente estatístico, ½ para tendência e ∅ para nenhum efeito.

## 6.2 EFEITO ANSIOLÍTICO DO AR NO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO

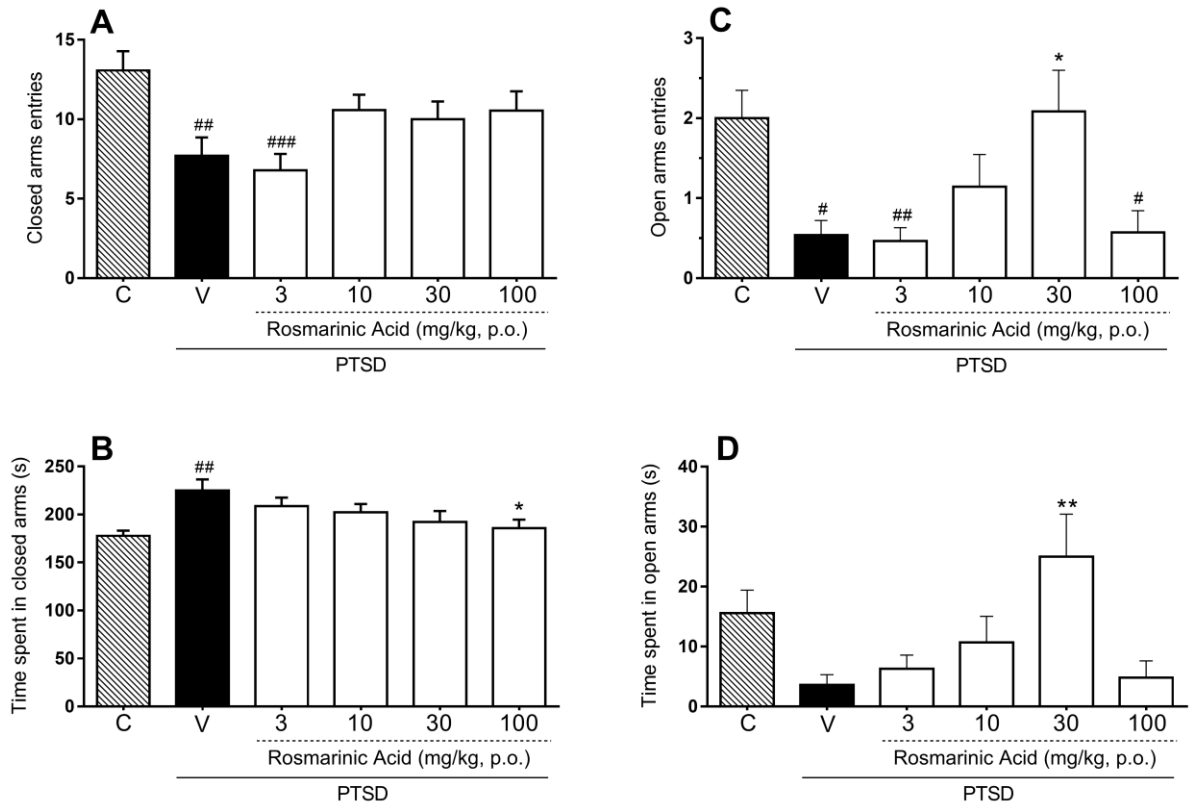
O efeito ansiolítico do AR foi analisado no LCE imediatamente após a reexposição dos camundongos ao aparato *step down* modificado. Os animais controle que não foram submetidos ao TEPT apresentaram tempo de aproximadamente 177,72 s e cerca de 13 entradas em média nos braços fechados, enquanto os animais submetidos ao TEPT apresentaram permanência de 225 s e cerca de 7,69 entradas nos braços fechados.

Nota-se que o número de entradas dos animais nos braços fechados apresentou redução nos grupos (V) e (3), mas tal parâmetro foi revertido nos grupos (10), (30) e (100) [ $F_{(5,74)} = 4,176$ ,  $p = 0,0021$ ] (**Fig. 15A**). O tempo gasto em braços fechados foi aumentado no grupo (V) e todos os quatro grupos foram iguais ao grupo (C), mas o grupo (100) também foi estatisticamente significativo do grupo (V) [ $F_{(5, 75)} = 3,258$ ,  $p = 0,0102$ ] (**Fig. 15B**).

O número de entradas nos braços abertos foi reduzido nos grupos (V), (3) e (100) em comparação ao grupo (C) e o grupo AR 30 grupo foi estatisticamente significativo em relação ao grupo não tratado (V) [ $F_{(5, 76)} = 5,064$ ,  $p = 0,0005$ ] (**Fig. 15C**), o tempo

gasto em braços abertos seguiu o mesmo perfil, no qual o grupo (30) foi obtive relevância estatística em relação ao grupo (V) [ $F_{(5, 75)} = 3,793$ ,  $p = 0,0041$ ] (**Fig. 15D**).

**Figura 15** - Efeito ansiolítico do AR no LCE durante evocação da memória aversiva do TEPT.

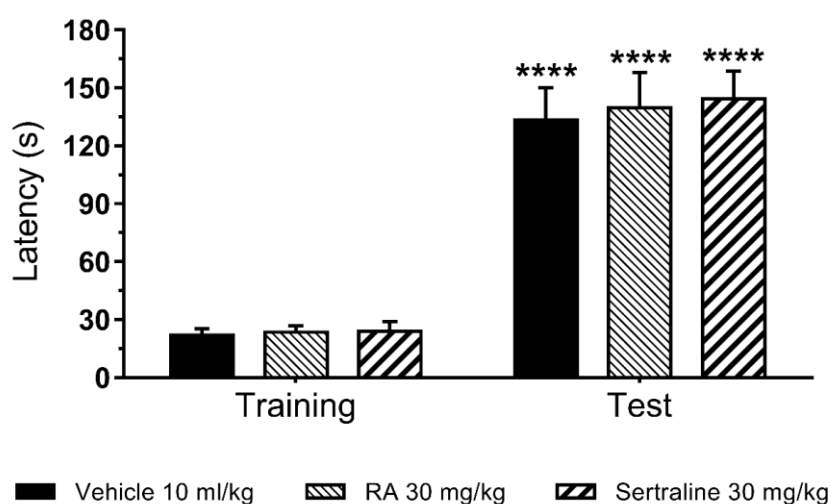


Legenda: Efeito do tratamento do AR sobre o comportamento de ansiedade avaliado no LCE imediatamente após a reexposição dos animais ao aparato de indução do TEPT. As respostas comportamentais observadas foram número de entradas nos braços fechados (**A**); tempo de permanência nos braços fechados (**B**); número de entradas nos braços abertos (**C**); tempo de permanência nos braços abertos (**D**). Cada coluna representa a média de 11/15 animais e as linhas verticais indicam o EPM. Os símbolos mostram significância estatística por meio da ANOVA de uma via seguida pelo pós-teste de Bonferroni. **###**  $p \leq 0,001$ , **##**  $p \leq 0,01$ , **#**  $p \leq 0,05$  em comparação com o grupo de control/veículo (C) e **\*\***  $p \leq 0,01$ , **\***  $p \leq 0,05$  em comparação com o grupo TEPT/veículo (V).

### 6.3 AVALIAÇÃO DE MEMÓRIA E APRENDIZADO NA ESQUIVA INIBITÓRIA

Os dados apresentados na **Fig. 16** referentes ao teste de esQUIVA inibitória, mostram claramente que os animais controle/veículo (10 ml/kg) permaneceram um período significativamente maior na plataforma no período de teste (fase de aquisição) [ $F_{(1, 31)} = 167,1$ ;  $p \leq 0,0001$ ] quando reexpostos ao aparato *step down* após 24h do período de treino (fase de retenção), indicando que ocorreu o aprendizado e desenvolvimento da memória aversiva. Tal comportamento, foi também observado nos animais tratados com o AR (30 mg/kg) ou sertralina (30 mg/kg).

**Figura 16** - Efeito do AR e da sertralina sobre a memória aversiva.



Legenda: Avaliação do efeito do AR e da sertralina sobre a memória aversiva de camundongos na esQUIVA inibitória. As respostas comportamentais observadas foram tempo de permanência na plataforma no período de treino (**training**) e tempo de permanência na plataforma no período de teste (**test**). Cada coluna representa a média de 11/12 animais e as linhas verticais indicam o EPM. Os símbolos mostram significância estatística por meio da ANOVA de duas vias seguida pelo pós-teste de Bonferroni. \*\*\*\*  $p \leq 0,0001$  comparando cada grupo com seu respectivo período de treino x teste.

### 6.4 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DE CORTICOSTERONA

Os dados apresentados na **Fig. 17A** mostram a concentração de corticosterona nos animais submetidos ao TEPT. A concentração sanguínea de corticosterona

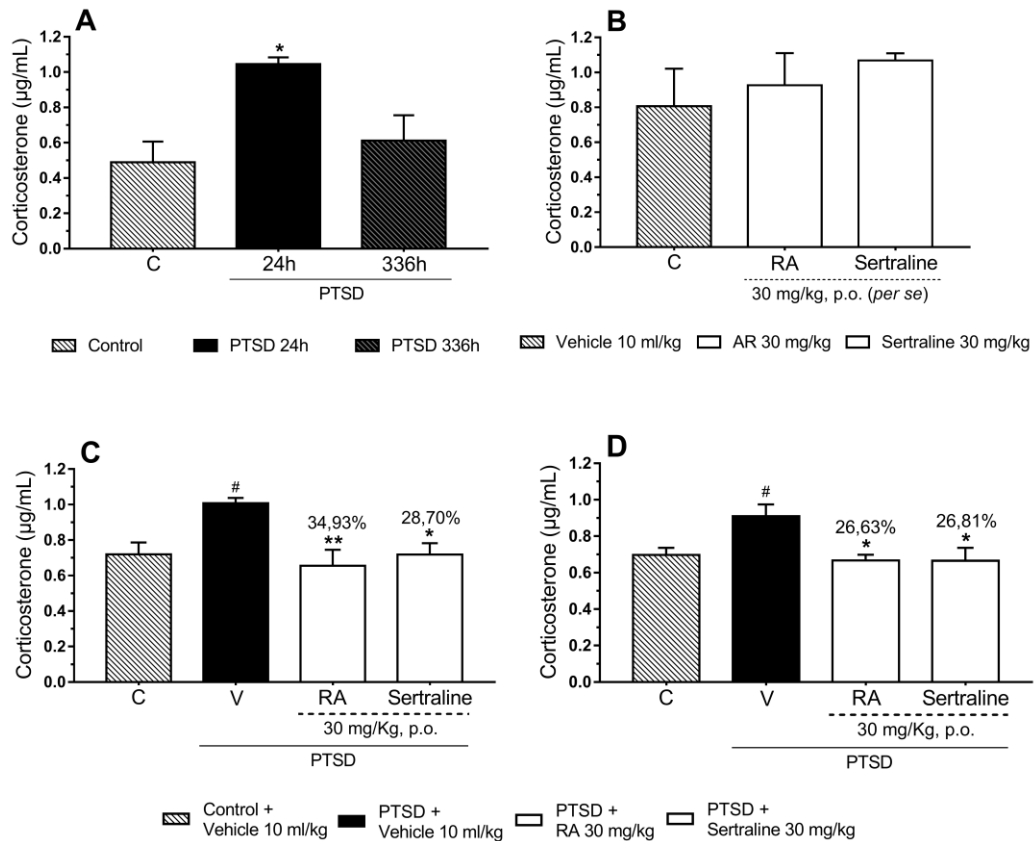
apresentou aumento significativo [ $F_{(2, 12)} = 5,185$ ;  $p = 0,0206$ ] após 24h e os níveis retornaram ao basal após 14 dias mediante as reexposições no 4<sup>o</sup>, 7<sup>o</sup>, 10<sup>o</sup> e 14<sup>o</sup> dia após indução do TEPT.

Além disto, foi observado que os tratamentos dos animais com AR (30 mg/kg) ou sertralina (30 mg/kg) por si só não foram capazes de promover alterações significativas [ $F_{(2, 18)} = 0,6293$ ;  $p = 0,5443$ ] da concentração sanguínea de corticosterona 24h após a administração em relação ao grupo controle/veículo (10 ml/kg) (**Fig. 17B**).

Já o tratamento com AR (30 mg/kg) ou sertralina (30 mg/kg) impediu o aumento da concentração sanguínea de corticosterona nos animais submetido ao TEPT, **Fig. 17C** e **Fig. 17D**, [ $F_{(3, 22)} = 5,93$ ;  $p = 0,0040$ ], não havendo diferença significativa entre os grupos tratados e o grupo controle negativo (C). Os tratamentos com AR ou sertralina, respectivamente preveniu em 34,93% e 28,70% o aumento de corticosterona 24h após o evento traumático.

Essa prevenção permaneceu por até 48h após a indução do TEPT nos animais, representando uma redução de 26,63% dos animais tratados com AR contra 26,81% do grupo tratado com sertralina [ $F(3, 24) = 5,235$ ,  $p = 0,0064$ ] (**Fig. 17D**). De tal forma, a secreção e liberação de corticosterona nos grupos tratados manteve-se equiparanda com o grupo controle negativo (C), ou seja, semelhante aos animais saudáveis em ambos os tempos (24 e 48h) após o evento traumático.

**Figura 17** - Dosagem de corticosterona no plasma sanguíneo.



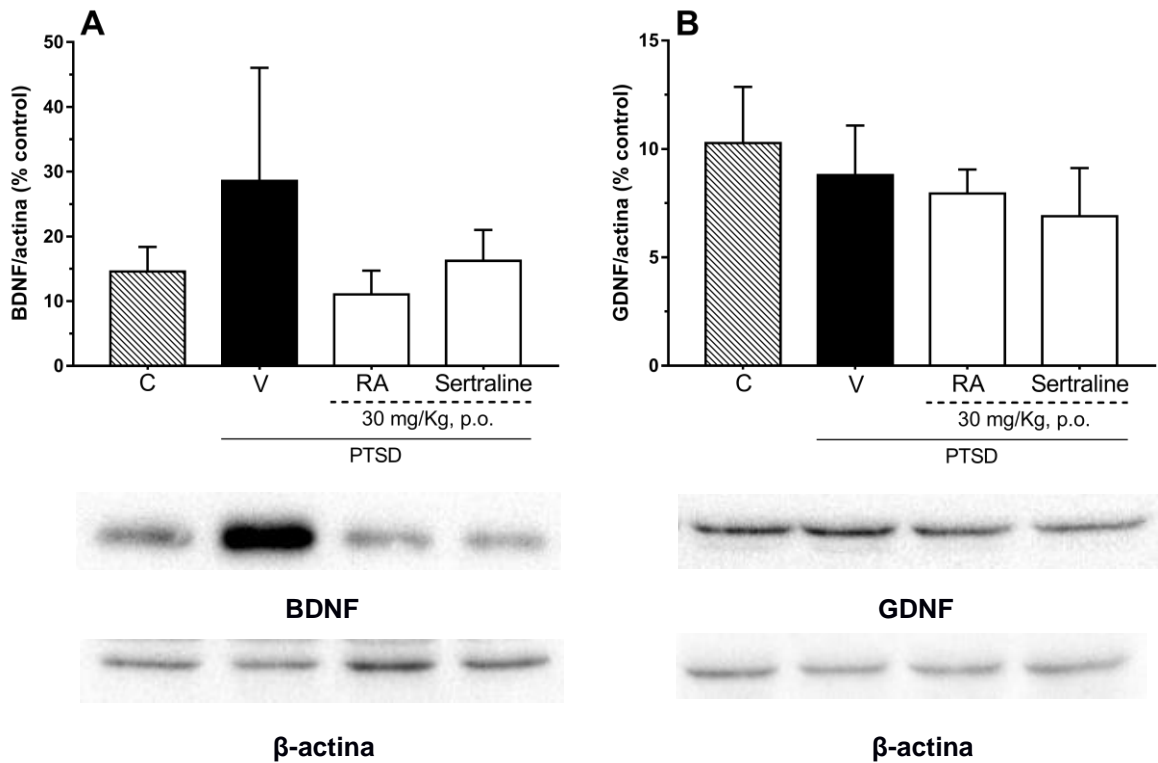
Legenda: Dosagem de corticosterona plasmática secretada e liberada no sangue dos animais. Os ensaios bioquímicos realizados foram secreção de corticosterona 24h e 14 dias após indução do trauma (**A**), cada coluna representa a média de 5/7 animais; efeito *per se* do veículo ou AR ou sertralina sobre a secreção e liberação de corticosterona plasmática (**B**), cada coluna representa a média de 7 animais; efeito do tratamento com AR ou sertralina na secreção e liberação de corticosterona plasmática 24h (**C**) ou 48h (**D**) após exposição ao trauma, cada coluna representa a média de 6/8 animais. As linhas verticais indicam o EPM. Os símbolos mostram significância estatística por meio da ANOVA de uma via seguida pelo pós-teste de Bonferroni. #  $p \leq 0,05$  comparado ao grupo controle/veículo (C) e \*\*  $p \leq 0,01$ , \*  $p \leq 0,05$  em comparação ao grupo PTSD/veículo (V).

## 6.5. QUANTIFICAÇÃO PROTÉICA DOS FATORES NEUROTROFICOS BDNF E GDNF NO HIPOCAMPO

A expressão protéica dos fatores neurotróficos BDNF e GDNF foi avaliada por imunoblot (**Fig. 18**) 24h após a indução do modelo de TEPT. A expressão protéica de BDNF no hipocampo [ $F(3, 10) = 0,799$ ,  $p = 0,5222$ ] (**Fig. 18A**) não foi alterada estatisticamente, mas os tratamentos apresentaram uma tendência em manter os

valores semelhantes ao grupo controle negativo (C) 24h após o evento traumático. Já a expressão protéica de GDNF (**Fig. 18B**) não foi diferente [ $F(3, 12) = 0,4497$ ,  $p = 0,7221$ ] entre os grupos analisados 24h após a indução do TEPT.

**Figura 18** - Expressão de fatores neurotróficos BDNF e GDNF no hipocampo.



Legenda: Efeito do tratamento com AR ou sertralina sobre a quantificação de fatores neurotróficos no hipocampo. Os ensaios bioquímicos realizados foram quantificação de BDNF (**A**) e quantificação de GDNF (**B**). Cada coluna representa a média de 3/4 animais e as linhas verticais indicam o EPM. A expressão de BDNF e o GDNF foram normalizadas com  $\beta$ -actina. Os símbolos mostram significância estatística por meio da ANOVA de uma via seguida pelo pós-teste de Bonferroni.

## 7 DISCUSSÃO

O TEPT é uma desordem neuropsiquiátrica relacionado a situações que envolvem traumas e distresses acentuados e resulta no importante prejuízo da qualidade de vida dos indivíduos afetados (APA, 2013). Tal fato ocorre devido ao profundo comprometimento mental, físico, ocupacional e funcional que o TEPT promove, em parte, devido a alteração na função neuronal no encéfalo, principalmente no giro dentado, no hipocampo, no CPF<sub>m</sub> e na amígdala (BREMNER, 1995). Considera-se que o estresse oxidativo e a neuroinflamação desempenham um papel importante na função neuronal, levando a rupturas na manutenção fisiológica do potencial redox nos neurônios, recrutamento de citocinas inflamatórias que interferem em diversos processos biológicos, culminando na degeneração e morte neuronal (JIA *et al.*, 2018; PETROVIC *et al.*, 2018).

Pesquisas envolvendo estudos com medo condicionado e a extinção de memórias aversivas (Pavloviano) apontam para evidências que atribuem mais embasamento científico de que o TEPT não é meramente e totalmente caracterizado por uma simples resposta aumentada do medo, mas sim uma disfunção primária no processo da aprendizagem adaptativa, o que leva a uma regulação do medo mal-adaptada e complexa de extinguir (DESS *et al.*, 1990; MINOR *et al.*, 1991; MINOR AND HUNTER, 2002; MAIER e SELIGMAN, 2016).

A extinção do medo, descrito pioneiramente por Pavlov em 1927 baseia-se em repetidas exposições a estímulos ansiogênicos para consolidar uma nova memória contrária a memória de medo original. Tal técnica é altamente relevante para distúrbios de medo, ansiedade e relacionados com traumas associados a reações emocionais negativas desencadeadas por objetos, situações ou percepções particulares internas/externas, e desnecessárias para o real perigo. Ademais, o processo de extinção em animais ocorre de forma equivalente em algumas abordagens psicoterápicas, inoculando estímulos específicos e desencadeando ansiedade sob maneira de tratar a ansiedade (FITZGERALD *et al.*, 2014).

Nesse contexto, o desenvolvimento de novas opções terapêuticas para o tratamento do TEPT faz-se necessário, principalmente os que visam processos antioxidantes e anti-inflamatórios. De fato, existem estudos pré-clínicos e clínicos que revelam as múltiplas atividades biológicas de compostos naturais, como o AR (AMOAH *et al.*, 2016) especialmente no que diz respeito a sua elevada capacidade antioxidante, antiinflamatória e antinociceptiva (SAMBONGI *et al.*, 2003), sendo grande parte dessas atividades biológicas já testadas em nossos laboratórios, porém ainda não publicados (PRESTI-SILVA, 2018; SANTOS, 2013). No entanto, apenas um relatório sobre os efeitos do AR em modelo pré-clínico de TEPT foi publicado até agora na literatura (NIE, PENG, LAO *et al.*, 2014). Nesse estudo, os pesquisadores identificaram a capacidade do AR na maior dose (10 mg/kg) em atenuar os efeitos típicos de TEPT em ratos machos Sprague Dawley adultos no LCE aumentando significativamente o número de entradas nos braços abertos, bem como o tempo de permanência nos braços abertos, além de diminuir de forma estatisticamente significativa o tempo de freezing desses animais quando reexpostos à uma câmara de choques sem qualquer novo estímulo apresentado (NIE, PENG, LAO *et al.*, 2014).

Portanto, no presente estudo, realizamos um conjunto de experimentos comportamentais e bioquímicos, a fim de investigar o potencial terapêutico desse poderoso antioxidante polifenólico na prevenção de alterações globais induzidas por um modelo animal de TEPT através do choque inescapável nas patas com robusta validade comportamental de face, constructo e predição, tendo em vista que esse paradigma mimetiza vários clusters relativos à heterogeneidade da patologia do TEPT, tais como: sintomas intrusivos, sintomas de evitação, alterações negativas no humor e cognição, sintomas de hipervigilância e tempo de duração considerável (FLANDREAU e TOTH, 2017).

Identificamos que o tratamento agudo no regime de dose de 30 mg/kg com o AR, 30 minutos após a indução do TEPT, melhora a atividade comportamental de medo e ansiedade, diminuindo o comprometimento emocional dos animais tratados. Nesse aspecto, os comportamentos de *freezing* e conseqüentemente de movimentação total são os aspectos comportamentais com maior validade de predição comportamental, devido ao maior poder do comportamento de *freezing* em indicar



de modo mais intenso e sensível, o comportamento de medo global presente no modelo animal de TEPT. O AR impediu a consolidação da memória aversiva e atenuou significativamente, 76,40% de redução no tempo de *freezing*, a evocação da memória do trauma dos animais machos quando reexpostos ao aparato. O mesmo ocorreu para as fêmeas que apresentaram 66,77% de redução no tempo de *freezing*. Nossos dados apontam para validar o efeito do AR não como algo isolado vinculado ao sexo, mas com ação independente sobre ambos os sexos, além disso corrobora com resultados da literatura em que a dose mais elevada de 10 mg/kg do AR administrada i.p. por 14 dias foi capaz de reduzir o tempo de *freezing* ou congelamento em ratos machos Sprague Dawley adultos submetidos a um modelo animal de TEPT (NIE, PENG, LAO *et al.*, 2014).

É interessante destacar que protocolo de indução do TEPT promoveu alterações comportamentais típicas de medo e ansiedade assim como mostrado nos experimentos com os animais machos e fêmeas, e foram atenuados também com a utilização da mesma dose de AR 30 mg/kg tanto para machos como fêmeas. Nas mesmas circunstâncias, os animais de 100 mg/kg começaram a apresentar uma piora dos parâmetros do etograma quando comparados com o grupo 30 mg/kg, o que trouxe para o perfil do experimento uma curva dose-resposta em forma de U em ambos estudos farmacológicos de rastreamento de dose.

A diminuição no comportamento exploração vertical ou *rearing*, quando o animal se posiciona sobre as duas patas traseiras sem apoio das patas dianteira elevadas ou na posição de exploração vertical do tipo “escalada” (*climbing*), quando o animal apoia as patas dianteiras em algum objeto ou parede, são interpretados como respostas defensivas de medo, na medida em que os camundongos assumem comportamentos de imobilidade na tentativa de defesa das possíveis ameaças inescapáveis (ANKUR *et al.*, 2013). O tratamento com o AR em camundongos machos foi capaz de prevenir a redução do comportamento de exploração vertical (*rearing/climbing*), e a sertralina mostrou uma resposta sutil, entretando com relação aos camundongos fêmeas tanto o AR quanto a sertralina não foram eficazes em reestabelecer o comportamento exploratório. Esse dado, reproduz respostas anteriores da sertralina no mesmo modelo de TEPT para camundongos fêmeas (BARROS, 2016).

O comportamento de autolimpeza ou *grooming* se apresentou inexistente nos animais submetidos ao TEPT, no entanto, os animais machos tratados com o AR, mas não os tratados com sertralina, revelaram uma melhora significativa na atividade de autolimpeza. O comportamento de *grooming* é modulado também por neurotransmissor dopamina e perturbações na sua concentração é capaz de produzir variações na expressão deste comportamento (KALUEFF *et al.*, 2016). Assim, é possível sugerir que o AR pode promover a redução do comportamento de medo e ansiedade por aumentar a transmissão dopaminérgica em áreas encefálicas relacionadas ao TEPT. Tal hipótese pode ser corroborada por dados ainda não publicados do estudo de Martins-Presti (2018), o qual mostrou que o AR possui efeito *per se* em aumentar o conteúdo dopaminérgico e serotoninérgico em regiões encefálicas em camundongos saudáveis. A despeito disso não se pode afirmar que essa hipótese seja o motivo da prevenção da redução do tempo de *grooming* nos animais machos com TEPT, é uma expectativa a ser investigada posteriormente, por meio de experimentos adicionais.

Nesse estudo, observamos nos animais tratados, no momento da reexposição ao aparato de TEPT, antes de sair do estado de *freezing* ou congelamento onde os animais apresentam uma imobilidade tenra com encolhimento do corpo, posição das orelhas juntapostas ao corpo, olhos parcialmente fechados e calda ereta para cima que os mesmos desempenham movimentos sutis de cabeça e de avaliação de risco, em que o animal avança e recua com o corpo. Isso é característico de uma maior capacidade de avaliar o risco presente no ambiente, quando comparados aos animais controles. Após perceberem a ausência de choques no aparato, esses animais tratados apresentavam nítida redução do comportamento de medo e dessa resposta defensiva, fato esse ausente nos animais tratados com veículo, os quais apresentavam *freezing* e grande imobilidade, reproduzindo dados anteriores observados por nós em outro tratamento antioxidante proposto para o mesmo modelo de TEPT em camundongos fêmeas (BARROS, 2016).

A dose de 30 mg/kg de AR também mostrou resultado estatisticamente significativo no LCE, um teste clássico utilizado no estudo comportamental de ansiedade em roedores (ZHAO *et al.*, 2016), aumentando o número de entradas e o tempo de

permanência dos animais nos braços abertos, ou seja, agindo como uma droga ansiolítica no modelo proposto. O modelo de TEPT animal diminuiu estatisticamente o número de entradas e o tempo de permanências nos braços abertos, reproduzindo dados da literatura, assim como aumentou o número de entradas e o tempo de permanência nos braços fechados (CERUTTI, 2014). De forma semelhante, conforme observaram em um estudo um aumento no percentual de entradas e no tempo de exploração nos braços abertos dos animais submetidos a 14 dias de tratamento com AR administrado i.p. (NIE, PENG, LAO *et al.*, 2014).

Não houve diferença entre os grupos no teste de esquia inibitória, utilizado na pesquisa de processos de aprendizagem e memória em roedores (GOLD, 1986; SOARES, 2011). Como observado nos testes anteriores, nenhum dos comportamentos relacionados a memória e aprendizagem da tarefa foram alterados, logo, confirmou-se que os resultados observados tanto na evocação da memória no aparato, quanto no LCE, são inerentes ao medo e ansiedade, não havendo viés com interações na memória aversiva. O tratamento com AR ou sertralina no regime posológico de 30 mg/kg identificado na curva dose-resposta realizada para ambos não demonstrou influência negativa na memória como amnesia ou alteração no tempo de latência de descida da plataforma em relação ao grupo tratado com veículo, confirmando que o AR pode ser uma alternativa tão segura quanto a sertralina, usada no tratamento do TEPT, uma vez que a retenção da tarefa aversiva no step down foi mantida.

A dosagem de corticosterona no plasma sanguíneo dos animais demonstrou que o modelo de TEPT eleva os níveis plasmáticos de corticosterona, sendo visível estatisticamente após 24h da indução do trauma e assemelhando-se ao grupo saudável após 14 dias do evento traumático e mediante sucessivas reexposições dos animais ao aparato gerador de choques. Essa elevação nos níveis de corticosterona a longo prazo leva a uma dessensibilização de receptores glicocorticóides e aumento do feedback negativo no eixo HHA, estas características também se assemelham ao status neuroendócrino de pacientes com TEPT (JIA *et al.*, 2018). Os tratamentos com AR e sertralina impediram significativamente essa alteração no eixo HHA, prevenindo a elevação da corticosterona em 34,93% nos animais tratados com AR e em 28,70% nos animais tratados com sertralina após

24h do evento traumático, mantendo-se capaz de prevenir a elevação de corticosterona em 28,70% (AR) e 26,81% (sertralina), 48h após o evento traumático. Dessa forma, esses dados claramente mostram que o AR ou a sertralina foram capazes de atuar positivamente sobre o eixo HHA impedindo a secreção e liberação de corticosterona plasmática nos animais avaliados 24h e 48h após o trauma e o AR apresentou maior eficácia que a sertralina na proteção do eixo HHA nos dois tempos avaliados.

Existem poucos estudos correlacionando o envolvimento de corticosterona e AR na literatura, e dentre eles, apenas um estudo melhor norteia a relação entre corticosterona e um modelo de distresse, o qual foi viabilizado por um paradigma de imobilização de ratos Wistar por 14 dias, utilizando o extrato de *Mentha arvensis* 100 mg/kg, bem como, seu extrato fermentado 100 mg/kg, ambos ricos em concentrações naturais de AR, os quais foram administrados i.g. por 14 dias 1h antes da imobilização dos animais. Os tratamentos demonstraram efeito protetor sobre os animais, diminuindo a secreção de corticosterona e  $\beta$ -endorfina sérica e aumentando níveis de serotonina sérica, sendo que o extrato fermentado regulou os indicadores fisiológicos relacionados ao distresse melhor que o extrato não-fermentado, resultado esse diretamente proporcional ao maior aumento na concentração de AR dosada por HPLC no extrato fermentado (TIAN *et al.*, 2018).

Aparentemente, o principal efeito do AR é sua capacidade em sequestrar os radicais livres e proteger as moléculas celulares do sistema de defesa oxidativa através da estimulação do sistema antioxidante endógeno e de sua grande capacidade de doar elétrons para os radicais reativos, convertendo-os em uma forma mais estável (MORENO *et al.*, 2006). Até mesmo o extrato de alecrim adicionado à dieta foi capaz de melhorar a atividade do estresse oxidativo no tecido neuronal de ratos idosos (RASOOLIJAZI *et al.*, 2015).

Como apontado pela literatura, o estresse oxidativo cerebral e marcadores inflamatórios parecem desempenhar um papel importante na neuropatologia e alterações fisiológicas do TEPT (MILLER *et al.*, 2018). Relatórios anteriores sugerem que o cérebro produz altos níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS) todos os dias, principalmente oriundos da cadeia respiratória mitocondrial e do desbalanço

redox do complexo nicotinamida-adenina-dinucleótido-fosfato (NADPH) oxidase ligado à membrana e voltado para o espaço extracelular das células. A família de enzimas NADPH oxidase (NOX) produz ROS como principal função, no qual um subproduto da atividade da cadeia respiratória mitocondrial, a subunidade de membrana catalítica gp91phox (NOX2), é altamente expressa em inúmeras desordens do SNC, gerando um ciclo de retroalimentação com produção de grandes quantidades de ROS (KRAUSE, 2007; SORCE e KRAUSE, 2009).

O cérebro deve estar preparado para lidar com essa carga excessiva de ROS na forma de ânion superóxido e peróxido de hidrogênio proveniente da cadeia respiratória ou transportadora de elétrons nas mitocôndrias porque a superprodução e as mudanças na homeostase redox mitocondrial foram apontadas no envolvimento em um grande número de circunstâncias neurológicas e em uma maioria da doença neurodegenerativas (ANGELOVA e ABRAMOV, 2018). Dessa forma, o risco de desenvolver TEPT torna-se significativo quando vivenciado um evento traumático. Isso é explicado pelo fato de que os neurônios terem um alto grau de plasticidade para manter as funções cerebrais normais. Portanto, a suplementação com antioxidantes como o AR pode reduzir a taxa de perda de neurônios, especialmente em neurônios catecolaminérgicos, que são mais suscetíveis a danos oxidativos (AASETH *et al.*, 2019; HERNANDEZ *et al.*, 2019; THEAL *et al.*, 2018; VAN DEN BERK-CLARK, *et al.*, 2018).

O extrato de *Rosmarinus officinalis* causou um efeito semelhante a um antidepressivo que pareceu ser mediado por uma interação com o sistema monoaminérgico e dependente de uma diminuição na ativação do receptor 5-HT<sub>3</sub>. A hipótese é de que a supressão da atividade do receptor 5-HT<sub>3</sub> foi reforçada pelo efeito similar ao antidepressivo sinérgico observado quando os camundongos foram tratados com MDL7222 (um antagonista seletivo do receptor de serotonina 5-HT<sub>3</sub> em combinação com uma dose sub-efetiva do extrato de *Rosmarinus officinalis* (Machado *et al.*, 2009).

Além do TEPT estar relacionado à hipofunção do hipocampo, CPF e hiperativação da amígdala, evidências também apontam para o papel da 5-HT nessa doença. Estudos epidemiológicos apontam uma correlação positiva entre a elevada ingestão

de polifenóis com uma redução no risco de uma série de doenças crônicas não transmissíveis (DCNT), incluindo as doenças neurodegenerativas, tais como a doença de Parkinson e Alzheimer (VAUZOUR *et al.*, 2010). Em modelos animais de TEPT a proliferação de células hipocâmpais é suprimida (HENDRIKSEN *et al.*, 2010; KIKUCHI *et al.*, 2008) e a apoptose neuronal aumentada (KASTER *et al.*, 2012; LI *et al.*, 2010, induzindo danos morfológicos com atrofia, perda de neurônios piramidais e redução da neurogênese no giro dentado. Em um estudo o AR foi capaz de de aumentar o diâmetro de esferas neurais de cultura celular hipocâmpal nas doses de 5 e 10 mg/kg, mas revertido por U0126, um inibidor seletivo da via de sinalização ERK, diminuindo a fosforilação de ERK1/2 (NIE, PENG, LAO *et al.*, 2014).

Dados não publicados sugerem que o AR por si só possua a capacidade em aumentar o conteúdo dos neurotransmissores serotonina e dopamina. No encéfalo saudável, ou seja, sem a indução de nenhum modelo de doença, o AR promoveu um ganho expressivo de dopamina (100%) e serotonina (69.8%), bem como de seus metabólitos, DOPAC (111, 22%), HVA (94%) e 5-HIAA (59,92%) no conteúdo estriatal em camundongos C57BL/6. Contudo, apesar do aumento do teor de monoaminas, não interferindo no comportamento motor normal dos animais (MARTINS-PRESTI, 2018). Os mecanismos detalhados envolvidos na melhoria do AR no sistema serotoninérgico e dopaminérgico em animais saudáveis ainda não estão claros. A literatura é escassa em relação ao papel do AR em sistemas monoaminérgicos em cérebros saudáveis.

No entanto, relatos anteriores mostraram que o AR, bem como o extrato de *Rosmarinus officinalis* aumentaram o conteúdo monoaminérgico contra diferentes distúrbios neurológicos (WANG *et al.*, 2011; RIZK *et al.*, 2017; MACHADO *et al.*, 2009). Um estudo farmacológico recente revelou que a administração do AR melhorou as monoaminas cerebrais na neurotoxicidade induzida pela doxorubicina em ratos e, além disso, o AR protegeu contra o estresse oxidativo, que se manifestou pela diminuição do malondialdeído (MDA) acompanhada do aumento do conteúdo de glutatona reduzida (GSH). Esses dados mostram que o AR protegeu da neurotoxicidade induzida pela doxorubicina por efeitos antioxidantes (RIZK *et al.*, 2017).

Já foi demonstrado que o estresse e a liberação de corticosterona são importantes reguladores dos receptores 5-HT<sub>1A</sub> do hipocampo (CHALMERS *et al.*, 1993). Curiosamente, mudanças na mediação hipocampal por respostas dos receptores 5-HT<sub>1A</sub> dependem se o estresse ou a corticosterona ativa predominantemente o receptor mineralocorticoide ou o receptor de glucocorticoide (MEIJER *et al.*, 1998). O TEPT é caracterizado por uma resposta desregulada ao estresse, o que pode resultar em alterações nos receptores 5-HT<sub>1A</sub> do hipocampo em humanos. O efeito ansiolítico das drogas ISRSs dependem dos receptores 5-HT<sub>1A</sub> uma vez que seu efeito é revertido quando administrado em camundongos *knockout* para receptores 5-HT<sub>1A</sub> (SANTARELLI *et al.*, 2013). Os receptores 5-HT<sub>1A</sub> são receptores acoplados a proteína Gi que quando ativados aumenta o influxo de K<sup>+</sup> na célula e inibe a atividade da adenilato ciclase (RAYMOND *et al.*, 1999). Esses receptores agem inibindo autorreceptores em neurônios serotoninérgicos no núcleo dorsal da rafe, mas também estão localizados pós-sinapticamente em diversas regiões encefálicas como substância cinzenta periaquedutal, amígdala, hipocampo e córtex frontal, algumas dessas regiões também envolvidas no TEPT (POLLANDT *et al.*, 2003). Em um estudo farmacológico com camundongos machos BALB/c o ácido gálico 60 mg/kg, um ácido fenólico com potencial antioxidante, assim como o AR, teve sua ação ansiolítica ou anti-imobilidade no teste de suspensão da cauda revertida com o pré-tratamento com PCPA 100mg/kg i.p. por 4 dias (antagonista da síntese de 5HT), quetanserina 5 mg/kg i.p. (antagonista de receptor 5HT<sub>2A/2C</sub>) e ondasetrona 0,3 mg/kg (antagonista de receptor 5HT<sub>3</sub>), mas não com NAN 190 0,5 mg/kg (antagonista de receptor 5HT<sub>1A</sub>), esses achados levam a entender que níveis elevados de serotonina nas sinápses são importantes para ocorrer a ação farmacológica do ácido gálico, juntamente com as contribuições dos receptores 5HT<sub>2A/2C</sub> e 5HT<sub>3</sub> (CAN *et al.*, 2017).

Esses fatores podem estar associados à elevada taxa de não adesão, resistência, recidivas, além dos inúmeros efeitos colaterais dos pacientes tratados com este fármaco, tais como disfunção sexual, sonolência, ganho de peso, insônia, ansiedade, tontura, dor de cabeça, boca seca, visão turva, náusea, erupção cutânea, tremores, astenia e mal-estar (SHEFFLER e ABDIJADID, 2019). Outros resultados negativos do uso de sertralina e paroxetina foram apontados em estudos,

monstrando indução à apoptose mediada por dano mitocondrial em astrócitos e células neuronais (THEN *et al.*, 2017).

Quanto aos fatores neurotróficos, apesar do *post hoc* de Bonferroni não apontar diferença estatística nas dosagens de BDNF, é nítido pelo perfil do gráfico que o AR promove uma manutenção dos níveis considerados saudáveis e semelhantes ao grupo controle negativo, comparando-se com o grupo não tratado TEPT/veículo que apresentou níveis mais elevados na expressão protéica de BDNF e compatíveis com a literatura 24h após a indução do modelo de TEPT animal em camundongos machos (CERUTTI, 2014). Da mesma forma, o tratamento de animais submetidos ao TEPT normalizou a expressão gênica de fatores neurotróficos BDNF e GDNF e TNF- $\alpha$  no hipocampo de camundongos fêmeas em um tratamento i.g. proposto com extrato hidroalcolico de *Polygala paniculata* na dose de 0,1 mg/kg, uma planta encontrada na flora brasileira e rica em derivados fitoquímicos antioxidantes (BARROS, 2016). O tratamento com AR na dose de 10 mg/kg i.g. por 14 dias também preveniu a variação de BDNF em um modelo subcrônico de TEPT animal (14 dias), revertendo os níveis desse fator neurotrófico aos níveis do grupo controle negativo (JIN e LIU *et al.*, 2013).

Em resumo, fornecemos a primeira descrição dos efeitos do AR em um modelo pré-clínico de TEPT em camundongos, focando nas alterações comportamentais e bioquímicas que esse tratamento promoveu, principalmente sobre o eixo HHA. Este trabalho traz novas evidências do potencial terapêutico demonstrado pelo AR em prevenir o aparecimento ou desenvolvimento da doença, principalmente pela manutenção comportamental dos animais tratados na dose de 30 mg/kg se compararem aos animais saudáveis na avaliação sistemática provida pela análise do etograma nos animais submetidos ao TEPT.

Faltam informações sobre o AR em modelos de TEPT animais e no TEPT humano, e pretendemos avaliar como uma prospecção se existe uma correlação linear de tratamento e efeitos do AR no TEPT humano clínico, uma vez que a dose de 30 mg/kg foi a dose eficaz capaz de produzir efeitos sobre parâmetros comportamentais e bioquímicos nos animais. Em vista disso, esses dados são promissores e sugerem um potencial do AR para prevenir o desenvolvimento da doença.



É importante ter consciência de que os conceitos aqui discutidos foram obtidos a partir de dados coletados em estudos pré-clínicos (modelos animais validados para TEPT) e, conseqüentemente, alerta é necessário para extrapolar esses resultados para o TEPT humano. Os resultados de pesquisas com animais são destinados a ajudar a promover hipóteses para estudos clínicos que, quando testados, podem orientar a descoberta de novos tratamentos ou refinamentos de tratamentos e estratégias farmacológicas ou não farmacológicas já existentes.

## 8 CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÃO

Depreende-se da elaboração desse estudo que o tratamento com o AR na dose de 30mg/kg em um modelo pré-clínico de TEPT demonstrou que:

- O AR preveniu o comportamento do medo e da ansiedade induzido pelo TEPT em camundongos.
- O tratamento com o AR na dose 30 mg/kg apresentou resultados que aproximam dos animais não submetidos ao modelo.
- O AR 30 mg/kg mostrou uma melhor eficiência no tratamento do TEPT em camundongos adultos machos e fêmeas comparado a sertralina 30 mg/kg nos parâmetros de medo e ansiedade avaliados;
- O teste de esQUIVA inibitória identificou do tratamento com AR 30 mg/kg que não há ação negativa ou inespecífica sobre a região hipocampal de memória e aprendizagem.
- A corticosterona no plasma dos animais do grupo TEPT tratados com AR 30 mg/kg foi semelhante ao dos animais controle, 24h e 48h após o evento traumático, demonstrando controle sobre a desregulação do eixo HHA característico desse transtorno neuropsiquiátrico.
- O AR 30 mg/kg apresentou tendência na manutenção dos níveis de expressão protéica de BDNF no hipocampo 24h após o evento traumático em relação ao grupo controle negativo e os níveis de expressão protéica de GDNF no hipocampo não apresentou diferença entre os grupos 24h após o evento traumático.

## 9 PERSPECTIVAS

- Proceder dosagem de 5-HT e 5-HIAA nos grupos experimentais dos animais submetidos ao TEPT e tratados com veículo, AR 30 mg/kg ou sertralina 30 mg/kg, comparando os tratamentos;
- Avaliar as expressões protéicas dos fatores neurotróficos BDNF e GDNF em outras regiões encefálicas, bem como de outras proteínas de relevância em processos neuroinflamatórios;
- Elucidar possíveis vias envolvidas no mecanismo de ação farmacológica do AR no TEPT;
- Avaliar a resposta nociceptiva, memória de curta e longa duração, comportamento compulsivo e anedonia dos animais submetidos ao TEPT e quanto aos respectivos tratamentos com veículo, AR 30 mg/kg ou sertralina 30 mg/kg.

## 10 REFERÊNCIAS

AASETH, J.; ROER G. E.; LIEN, L, BJØRKLUND, G. Is there a relationship between PTSD and complicated obesity? A review of the literature. **Biomed. Pharmacother.** 2019. doi: 10.1016/j.biopha.2019.108834.

AHER, V.D., WAHI, A., PAWDEY, A.M., SONAWANE, A. Antioxidants as immunomodulator: an expanding research avenue, **Int J Curr Pharm Res.** 3. 8-10 ISSN-09757066. 2011.

AIRAKSINEN, M.S.; SAARMA, M. The GDNF family: signalling, biological functions and therapeutic value. **Nat. Rev. Neurosci.** 2002. 3(5):383-94.

AMOAH, S. K. S.; SANDJO, L. P.; KRATZ, J. M. *et al.*, Rosmarinic aci-Pharmaceutical and Clinical Aspects. **Planta Med.** 82. 388-406. 2016. doi: 10.1055/s-0035-1568274.

ANGELOVA, P. R. e ABRAMOV, A. Y. Role of mitochondrial ROS in the brain: from physiology to neurodegeneration. **FEBS Letters.** 2018. 592(5), 692–702. doi: 10.1002/1873-3468.12964.

ANKUR, J.; MAHESH, R.; BHATT, S. Anxiolytic-like effect of etazolate, a type 4 phosphodiesterase inhibitor in experimental models of anxiety. **Indian. J. Exp. Biol.** 51 (6):444-449, 2013.

American Psychiatric Association (2010). **Diagnostic and statistical manual of mental disorders.** (4th ed.). Washington, DC: Author.

American Psychiatric Association (2013). **Diagnostic and statistical manual of mental disorders.** (5th ed.). Washington, DC: Author.

AZMITIA, E.C. Serotonin neurons, neuroplasticity, and homeostasis of neural tissue. **Neuropsychopharmacology.** 1999. 21(2 Suppl): 33-45.

BAILEY, K. R.; CRAWLEY, J. N, Chapter 5: Anxiety-Related Behaviors in Mice. **Methods of Behavior Analysis in Neuroscience**. 2nd edition. 2009.

BARROS, T. F. **Avaliação comportamental e bioquímica do efeito do extrato de *Polygala paniculata* na neuroinflamação induzida pelo modelo de transtorno de estresse pós-traumático em camundongos**. 2016. 115 f. Dissertação (Mestrado em Neurociências) - Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina. 2016.

BERGER, W., *et al.* Partial and Full PTSD in Brazilian Ambulance Workers: Prevalence and Impact on Health and Quality of Life. **Journal of Traumatic Stress**, 20(4), 637-642. doi: 10.1002/jts.20242.

BORGES, D. P. **Avaliação da toxicidade aguda do ácido rosmarínico**. 2015. Monografia. 2015. 37 f. Monografia (Bacharel em Farmácia) – Unidade Universitária de Ciências Exatas e Tecnológicas, Universidade Federal de Goiás, Anápolis. 2015.

BHORKAR *et al.* 2014. Involvement of the central melanocortin system in the effects of caffeine on anxiety-like behavior in mice. **Life Sciences**. Volume 95, Issue 2, 30 January 2014, Pages 72-80.

BLAKELY, R. D., De Felice LJ *et al.* (1994). Molecular physiology of norepinephrine and serotonin transporters. **J Exp Biol**. 196: 263-81.

BLUNDELL J. E., (1992). Serotonin and the biology of feeding. **Am J Clin Nutr**. 55(1 Suppl): 155-159.

BONFERRONI C. E. (1936). Teoria estatística de classes e cálculo de probabilidades. **Publicações do Instituto Superior de Ciências Econômicas e Comerciais de Florença**. 8: 3-62.

BOROWSKY B and HOFFMAN B. J. (1995) Neurotransmitter transporters: molecular biology, function, and regulation. **Int Rev Neurobiol**. 38: 139-99.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**. 72, 1976. doi 10.1016/0003-2697(76)90527-3.

BRASIL. **Ministério da Saúde**. Portaria 344, 1998.

BRAUN D, MADRIGAL JL, FEINSTEIN DL. Noradrenergic regulation of glial activation: molecular mechanisms and therapeutic implications. **Curr Neuropharmacol**. 2014;12(4):342-352. doi: 10.2174/1570159X12666140828220938

BREMNER, J. D., RANDALL, P., SCOTT, T. M., BRONEN, R. A., SEIBYL, J. P., SOUTHWICK, S. M., ... INNIS, R. B. MRI-based measurement of hippocampal volume in patients with combat-related posttraumatic stress disorder. **American Journal of Psychiatry**, 152, 973–981. 1995.

CALIXTO, J. B. *et al*. Contribution of natural products to the discovery of the transient receptor potential (TRP) channels family and their functions. **Pharmacology & Therapeutics**. v. 106, p. 179-208, 2005.

CALIXTO, J. B. *et al*. Inflammatory pain: kinins and antagonists. **Current Opinion in Anaesthesiology**. v. 14, n. 5, p. 519-26, 2001.

CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v. 33, p. 179-189, 2000.

CAN, Ö. D.; TURAN, N.; DEMIR ÖZKAY, Ü.; ÖZTÜRK, Y. Antidepressant-like effect of gallic acid in mice: Dual involvement of serotonergic and catecholaminergic systems. **Life Sciences**. 2017, 190, 110–117. doi: 10.1016/j.lfs.2017.09.023.

CERUTTI, M. L. **Avaliação comportamental de camundongos submetidos ao modelo de transtorno por estresse pós-traumático: uma abordagem emocional e bioquímica**. 2014. Dissertação de Mestrado. 2014. 80 f. Dissertação (Mestrado

em Neurociências) – Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina. 2014.

CIPRIANI, A.; WILLIAMS, T.; NIKOLAKOPOULOU, A.; SALANTI, G.; CHAIMANI, A.; IPSEY, J.; COWEN, P. J.; GEDDES J. R.; STEIN, D. J. Comparative efficacy and acceptability of pharmacological treatments for post-traumatic stress disorder in adults: a network meta-analysis. **Psychological Medicine**. 2017. 48(12), 1975–1984. doi: 10.1017/s003329171700349x

CHALMERS DT, KWAK SP, MANSOUR A, AKIL H, WATSON SJ. Corticosteroids regulate brain hippocampal 5-HT<sub>1A</sub> receptor mRNA expression. **J Neurosci**. 13:914-23. 1993

CLAPP J. D, *et al*. An examination of the synergy of pain and PTSD on quality of life: Additive or multiplicative effects? **Pain**. 2008; 138:301-309.

COOPER J, BLOOM F, ROTH R. The Biochemical Basis of Neuropharmacology. 6 edition. 1991.

DAVID, D. J.; GARDIER, A. M. Les bases de pharmacologie fondamentale du système sérotoninergique : application à la réponse antidépressive. **L'Encéphale**. 2016. 42(3), 255-263. doi: 10.1016/j.encep.2016.03.012

DASKALAKIS, N. P.; LEHRNER, A.; YEHUDA, R. Endocrine Aspects of Posttraumatic Stress Disorder and Implications for Diagnosis and Treatment. **Endocrinol. Metab. Clin. N Am**. 2013. 42 503–513,

DASKALAKIS, N. P.; YEHUDA, R.; DIAMOND, D. M. Animal models in translational studies of PTSD. *Psychoneuroendocrinology*. 2013. 38, 1895-1911,

DEAKIN, J.F.W.; GRAEFF, F.G. 5-HT and mechanisms of defence. **J Psychopharmacol**. 1991. 5: 305-315.

DEARMOND, S. J.; FUSCO, M. M.; DEWEY, M. M. **Structure of the Human Brain: A Photographic Atlas**. Oxford Univ. Press, New York, 3rd ed., 1989.

DESS, N. K.; MINOR, T.; TRAUNER, M.; LEE, C. Modeling the signal features of an escape response: the effects of cessation conditioning in the “learned helplessness” paradigm. **J. Exp. Psychol.** 1990. v.16, 123-136. doi: 10.1037//0097-7403.16.2.123

DU, J; ZHU, M, BAO, H. *et al.* The Role of Nutrients in Protecting Mitochondrial Function and Neurotransmitter Signaling: Implications for the Treatment of Depression, PTSD, and Suicidal Behaviors. **Crit Rev Food Sci Nutr.** 2016; 56(15):2560-2578.

DUCRAY, A.; *et al.* GDNF-family ligands display distinct action profiles on cultured GABAergic and serotonergic neurons of rat ventral mesencephalon. **Brain Res.** 2006. 1069: 104-112.

EATON, M. J; GUDEHITHLU, K. P. *et al.* (1993) Distribution of aromatic L-amino acid decarboxylase mRNA in mouse brain by in situ hybridization histology. **J Comp Neurol.** 337(4): 640-54.

EINAT H; YUAN P; GOULD T.D; LI J; DU J; ZHANG L; MANJI HK; CHEN G. The role of the extracellular signal-regulated kinase signaling pathway in mood modulation. **J Neurosci.** 2003. 23:7311–7316 14.

FALKENSTEIN, E.; WEHLING, M. 2000. Nongenomically initiated steroid actions. **Eur J Clin Invest;** 30:51-4.

FARNSWORTH, N. R. Biological and phytochemical screening of plants. **Journal of Pharmaceutical Science.** 1966. v. 55, p. 225-276.

FLANDREAU, E. I.; TOTH, M. Animal models of PTSD: a critical review. **Curr Topics Behav Neurosci.** 2017. doi 10.1007/7854\_2016\_65.



FRANCATI, V.; VERMETTEN, E.; BREMNER, J. D. Functional neuroimaging studies in posttraumatic stress disorder: review of current methods and findings, **Drepress. Anxiety**. v. 24, p. 202-2018. 2007.

FILE, S. E, 1980. The use of social interaction as a method for detecting anxiolytic activity of chlordiazepoxide-like drugs. **J. Neurosc. Methods**, 2, 219-238.

FILE, S. E; SETH, P, 2003. A review of 25 years of the social interaction test. **European Journal of Pharmacology**. Volume 463, Issues 1–3, 28 February 2003, p. 35-53. Animal Models of Anxiety Disorders.

FITZGERALD, P. J.; SEEMANN, J. R.; MAREN, S. Can fear extinction be enhanced? A review of pharmacological and behavioral findings. **Brain Res. Bull.** 46–60, 2014.

FREUD, S. **Estudos sobre histeria**. In: Edição Standard brasileira das obras completas de Sigmund Freud. Rio de Janeiro: Imago; 1893- 1895. p. 13-59. Vol. II.

FREUD, S. **Hereditariedade e a etiologia das neuroses**. In: Edição standard brasileira das obras completas de Sigmund Freud. Rio de Janeiro: Imago; 1896. p. 163-79. Vol. III.

FREUD, S. **Novos comentários sobre as neuropsicoses de defesa**. In: Edição standard brasileira das obras completas. Rio de Janeiro: Imago; 1896. p. 183-211. Vol. III.

FREUD S. **A Etiologia da Histeria**. In: Edição Standard Brasileira das Obras Completas. Rio de Janeiro: Imago; 1896. p 215-49. Vol III.

GILANI, A. H.; RAHMAN, A. U. Trends in ethnopharmacology. **Journal of Ethnopharmacology**. 2005. v. 100, p. 43-49.

GOLD, P. E. The use of avoidance training in studies of modulation of memory storage. **Behavioral and Neural Biology**, v. 46, n. 1, p. 87–98, 1986.

GREEN, C. R.; CORSI-TRAVALI, S.; NEUMEISTER, A. The Role of BDNF-TrkB Signaling in the Pathogenesis of PTSD. **J. Depress. Anxiety**. 4:(S4), 2013.

GRAEFF, F. G e GUIMARÃES F. S. Fundamentos de Psicofarmacologia. São Paulo, Editora Atheneu. 1999.

GRUBBS, F. E. Procedures for detecting outlying observations in samples. **Technometrics**. 11, 1-21 (1969).

HAUBENSAK, W.; KUNWAR, P. S, CAI, H.; CIOCCHI, S.; WALL, N. R.; PONNUSAMY, R.; BIAG J.; DONG, H. W.; DEISSEROTH, K.; Callaway, E. M. *et al.* Genetic dissection of an amygdala microcircuit that gates conditioned fear. **Nature**. 468:270–276 67. 2010.

HAYLEY S; POULTER M.O; MERALI Z; ANISMAN H. The pathogenesis of clinical depression: stressor- and cytokine-induced alterations of neuroplasticity. **Neuroscience**. 2005. 135:659–678

HENDRIKSEN, H.; PRINS, J.; OLIVIER, B.; OOSTING, R. S. Environmental Enrichment Induces Behavioral Recovery and Enhanced Hippocampal Cell Proliferation in an Antidepressant-Resistant Animal Model for PTSD. **PLoS ONE**. 2010. 5(8), e11943.doi:10.1371/journal.pone.0011943.

HERMAN J. **Trauma and recovery**. New York: Basic Books; 1992.

HERNANDEZ, D. C.; DAUNDASEKARA, S. S.; ARLINGHAUS, K. R.; SHARMA, A. P.; REITZEL, L. R.; KENDZOR, D. E.; BUSINELLE, M. S. Fruit and vegetable consumption and emotional distress tolerance as potential links between food insecurity and poor physical and mental health among homeless adults. **Prev Med Rep**. 2019. doi: 10.1016/j.pmedr.2019.100824

HERTZBERG, M.A.; FELDMAN, M.E.; BECKHAM, J.C.; KUDLER, H.S.; DAVIDSON J.R. Lack of efficacy for fluoxetine in PTSD: a placebo controlled trial in combat veterans. **Ann Clin Psychiatry**. 2000; 12: 101-5.

HOYLER, D; HANNON, J. P; MARTIN, G. R. Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors. **Pharmacol Biochem Behav.** 2002. 71 (4): 533-554.

IZQUIERDO, I.; MEDINA, J. H. Memory formation: the sequence of biochemical events in the hippocampus and its connections to activity in other brains structures. **Neurobiol. Learn Mem.** v. 68, n. 3, p. 285-316. 1997.

JANELIDZE, S.; *et al.* Cytokine levels in the blood may distinguish suicide attempters from depressed patients. **Brain Behav Immun.** 25:335–339, 2011.

JIA, Y.; HAN, Y.; WANG, X.; HAN, F. Role of apoptosis in the Post-traumatic stress disorder model-single prolonged stressed rats. **Psychoneuroendocrinology.** 2018. doi: <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2018.05.015>

JIN and LIU *et al.* Rosmarinic acid ameliorates depressive-like behaviors in a rat model of CUS an up-Regulates BDNF level in the hippocampus and hippocampal-derived astrocytes. **Neurochem Research.** 2013.

JONES, K. A.; THOMSEN, C. The role of the innate immune system in psychiatric disorders. **Mol Cell Neurosci.** 53 52–62, 2013.

JOVANOVIC, T.; NORRHOLM, S. D.; FENNEL. J. E.; KEYES. M.; FIALLOS, A. M.; MYERS, K. M.; DAVIS, M.; DUNCAN, E. J. Posttraumatic stress disorder may be associated with impaired fear inhibition: relation to symptom severity. **Psychiatry Rev.** v. 167, p. 151-160. 2009.

KALUEFF, A.V.; *et al.* Neurobiology of rodent self-grooming and its value for translational neuroscience. **Nat. Rev. Neuroscience.** 17(1):4559, 2016.

KANDEL, E. R.; SCHWARTZ, J. H.; JESSELL, T. M.; SIEGELBAUM, S. A.; HUDSPETH, A. J. **Principles of Neural Science**, McGraw-Hill Education / Medical; 5th edition.

KASTER, M. P.; GADOTI, V. M.; CALIXTO, J. B.; SANTOS, A. R.; RODRIGUES, A. L. Depressive-like behavior induced by tumor necrosis factor-alpha in mice. **Neuropharmacology**. 2012; 62:419-26.

KELM, M. A., NAIR, M. G., STRASBURG, G. M., DEWITT, D. L. Antioxidant and cyclooxygenase inhibitory phenolic compounds from *Ocimum sanctum* Linn. **Phytomedicine**. 2000. 7(1), 7-13. doi: 10.1016/s0944-7113(00)80015-x.

KELMENDI, B.; ADAMS T. G.; YARNELL, S.; SOUTHWICK, S.; ABDALLAH, C. G.; KRYSTAL, J. H. PTSD: from neurobiology to pharmacological treatments. **Eur J Psychotraumatol**. 7. 2016. doi: 10.3402/ejpt.v7.31858.

KETCHESIN, K. D.; STINNETT, G. S.; SEASHOLTZ, A. F. Corticotropin-releasing hormone-binding protein and stress: from invertebrates to humans. **Stress**. 2017. 20(5), 449–464. doi: 10.1080/10253890.2017.1322575.

KIKUCHI, A.; SHIMIZU, K.; NIBUYA, M.; HIRAMOTO, T.; KANDA, Y.; TANAKA, T.; WATANABE, Y.; TAKAHASHI, Y.; NOMURA, S. Relationship between post-traumatic stress disorder-like behavior and reduction of hippocampal 5-bromo-2'-deoxyuridine-positive cells after inescapable shock in rats. **Psychiatry and Clinical Neurosciences**. 2008. 62(6), 713-720. doi: 10.1111/j.1440-1819.2008.01875.x

KIM, J.; GORMAN, J. The Psychobiology of anxiety. **Clinical Neuroscience Research**. v. 4, p. 335-47, 2005.

KIMURA, Y.; OKUDA, H.; OKUDA, T.; HATANO, T.; ARICHI, S. Effects of caffetannins and related compounds on arachidonate metabolism in human polymorphonuclear leukocytes. **J. Nat. Prod**. 1987. 50, 392.

KONOPLEVA, M.; KONOPLEV, S.; HU, W.; ZARITSKEY, A. Y.; AFANASIEV, B. B.; ANDREEFF, M. Stromal cells prevent apoptosis of AML cells by up-regulation of anti-apoptotic proteins. **Leukemia**. v. 16, p. 1713-1724. 2002.

KORSMEYER, S.J., WEI, M.C., SAITO, M., WEILER, S., OH, K.J., SCHLESINGER, P.H. Pro-apoptotic cascade activates BID, which oligomerizes BAK or BAX into pores that result in the release of cytochrome c. **Cell Death Differ**; 7 (12):1166–73. 2000.

KRAUSE, K. Aging: A revisited theory based on free radicals generated by NOX family NADPH oxidases. **Experimental Gerontology**, 42, 256–262. 2007. doi: 10.1016/j.exger.2006.10.011

LABORDA, M. A.; MILLER, R. R. Reactivated memories compete for expression after Pavlovian extinction. **Behav Processes**. 90, 20-27, 2012.

LANIUS, R. A.; BLUHM, R.; LANIUS, U.; PAIN, C. A review of neuroimaging studies in PTSD: heterogeneity of response to symptom provocation. **J. Psychiatr. Rev.** v. 40, p. 709-729. 2006.

LI, X. M.; HAN, F.; LIU, D. J.; SHI, Y. X.; Single-prolonged stress induced mitochondrial-dependent apoptosis in hippocampus in the rat model of post-traumatic stress disorder. **J. Chem. Neuroanat.** 2010. 40:248-55. doi: 10.1016/j.jchemneu.2010.07.001.

LINDSTEN, T.; ZONG, W. X.; THOMPSON, C. B. Defining the role of the Bcl-2 family of proteins in the nervous system. **Neuroscientist**; 11 (1):10–5. [11]. 2005.

LIPOV, E.; KELZEMBERG, B. Sympathetic system modulation to treat post-traumatic stress disorder (PTSD): A review of clinical evidence and neurobiology. **Journal of Affective Disorder**, v. 142, p. 1-5. 2012.

LIU, X.; RAMIREZ, S.; PANG, P. T.; PURYEAR, C. B.; GOVINDARAJAN, A.; DEISSEROTH, K.; TONEGAWA, S. Optogenetic stimulation of a hippocampal engram activates fear memory recall. **Nature**. 484:381–385 68. 2012.

MAHAN, A. L, RESSLER, K. J. Fear conditioning, synaptic plasticity and the amygdala: implications for posttraumatic stress disorder. **Trends Neurosci**. 35:24–35. 2012.

MAIER, S. F., SELIGMAN, M. E. Learned helplessness at fifty: insights from neuroscience. **Psychol. Rev.** 123, 349. 2016. doi: 10.1037/rev 0000033

MAYES, R.; HORWITZ, A. DSM-III and the revolution in the classification of mental illness. In: **Journal of the history of the behavioral Sciences.** v. 41, n. 3, p. 249-267, 2005.

MACHADO, D. G.; BETTIO, L. E., CUNHA, M. P. *et al.* Antidepressant-like effect of the extract of *Rosmarinus officinalis* in mice: involvement of the monoaminergic system. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.** 4. 642-50. 2009. doi: 10.1016/j.pnpbp.2009.03.004.

MCLAUGHLIN, K. A.; CHONRON, K. J.; KOENEN, K. C.; GILMAN, S. E. Childhood adversity, adult stressful life events and risk of past-year psychiatric disorder: a test of the stress sensitization hypothesis in a population-based sample of adults. **Psychol. Med.** v. 40, p. 1647-1658. 2010.

MEIJER, O. C.; KORTEKAAS, R.; OITZL, M. S.; DE KLOET, E. R. Acute rise in corticosterone facilitates 5-HT<sub>1A</sub> receptor-mediated behavioural responses. **Eur J Pharmacol;** 351:7-14. 1998.

MENESES, A. Physiological, Pathophysiological and Therapeutic Roles of 5-HT Systems in Learning and Memory. **Reviews in the Neurosciences,** 9, 275-289. 1998.

MIFSUD, K. R.; REUL, J. M. H. M. Mineralocorticoid and glucocorticoid receptor-mediated control of genomic responses to stress in the brain. **Stress.** 2018. 1-14. doi: 10.1080/10253890.2018.1456526

MILLER, M. W.; LIN, A. P.; WOLF, E. J.; MILLER, D. R. Oxidative stress, inflammation, and neuroprogression in chronic PTSD. **Harvard Review of Psychiatry,** 26, 57–69. 2018. doi: 10.1097/HRP.0000000000000167

MINOR, T. R., DESS, N. K., OVERMIER, J. B. "Inverting the traditional view of "learned helplessness"," in *Fear, Avoidance, and Phobias: A Fundamental Analysis*, ed M. R. Denny (Hillsdale, NJ: Lawrence Erlbaum Associates, Inc.), 87–133. 1991.

MINOR, T. R., HUNTER, A. M. Stressor controllability and learned helplessness research in the United States: sensitization and fatigue processes. **Integr. Physiol. Behav. Sci.** 37, 44–58. 2002. doi: 10.1007/BF02688805

MORENO, S.; SCHEYER, T.; ROMANO, C. S. *et al.* Antioxidant and antimicrobial activities of rosemary extracts linked to their polyphenol composition. **Free Radic Res.** 40. 223-31. 2006. doi: 10.1080/10715760500473834

NAJAVITS, L. M. The problem of dropout from "gold standard" PTSD therapies. **F1000Prime Rep.** 2015; 7:43. 2015. doi: 10.12703/P7-43

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Pricípios de Bioqúimica de Lehninger.** 7<sup>a</sup> ed. Porto Alegre: Artmed, 2019.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; KINGSTON, D. G. I. Natural Products as Pharmaceuticals and Sources for Lead Structures. In: WERMUTH, C. G. **The Practice of Medicinal Chemistry.** 2008. 3 ed. Elsevier. p. 159-186.

NIE, H.; PENG, Z.; LAO, N.; WANG, H.; CHEN, Y.; FANG, Z.; HOU, W.; GAO, F.; LI, X.; XIONG, L.; TAN, Q. Rosmarinic acid ameliorate PTSD-like symptoms in a rat model and promotes cell proliferation in the hippocampus. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry.** 2014. doi 10.1016/j.pnpbp.2014.01.002.

PACE, T. W. W.; HEIM, C. M. A short review on the psychoneuroimmunology of posttraumatic stress disorder: From risk factors to medical comorbidities. **Brain Behav Immun.** 25 6–13, 2011.

PAPE, H. C.; PARE, D. Plastic synaptic networks of the amygdala for the acquisition, expression and extinction of conditioned fear. **Physiol. Rev.** v. 90, p. 419-463. 2010.

PATEL, R. *et al.* Neurocircuitry models of posttraumatic stress disorder and beyond: A meta-analysis of functional neuroimaging studies. **Neurosci. Biobehav. Rev.** 36: 2130-2142, 2012.

PANAREAKIS, T.; POKROVSKAJA, K.; SHOSHAN, M. C.; GRANDÉR, D. Activation of Bak, Bax and BH3-only proteins in the apoptotic response to doxorubicin. **J. Biolumin Chemilumin.** v. 277, p. 44317-44326. 2002.

PETERSEN, M.; SIMMONDS, M. S. Rosmarinic acid. **Phytochemistry.** 62. 121-125. 2003. doi: 10.1016/S0031-9422(02)00513-7.

PETROVIC, R.; PUSKAS, L.; DOZUDIC, G. J. *et al.* NADPH oxidase and redox status in amygdala, hippocampus and cortex of male Wistar rats in an animal model of post-traumatic stress disorder. **Stress.** 2018. DOI: 10.1080/10253890.2018.1474874

PHILBERT, J.; PICHAT, P.; BEESKÉ, S.; DECOBERT, M.; BELZUNG, C.; GRIEBEL, G. Acute inescapable stress exposure induces long-term disturbances and avoidance behavior: a mouse model of post-traumatic stress disorder (PTSD). **Behav. Brain Res.** v. 221, p. 149-54. 2011.

PHILLIPS, M. R. (2009). Is distress a symptom of mental disorders, a marker of impairment, both or neither? **World Psychiatry**, v. 8(2), 91-92. 2009

PINHEIRO, M. L. *Efeitos da separação materna sobre o comportamento, a imunidade inata e o crescimento tumoral.* Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Psicologia. Área de concentração – Neurociências e Comportamento). Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo. São Paulo. 2008.

POLESEL *et al.* Anxiety-like effects of meta-chlorophenylpiperazine in paradoxically sleep-deprived mice. **Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry.** v. 49. p. 70-7. 2014.



PORSOLT, R. D; Animal model of Depression. **Biomedicine**. v. 30, p. 139-140. 1979.

PRESTI-SILVA, S. M. **Efeitos do tratamento com ácido rosmarínico em parâmetros bioquímicos e motores em modelo pré-clínico da doença de Parkinson**. 2018. 96 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Farmacologia) - Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Espírito Santo, Espírito Santo. 2018.

PYNNOS, R. S.; RITZMANN, R. F.; STEINBERG, A.M.; GOENJIAN, A.; PRISECARU, I. A behavioral animal model of posttraumatic stress disorder featuring repeated exposure to situational reminders. **Biol. Psychiatry**. v. 39, p. 129-34. 1996.

RATES, S., Plants as source of drugs, **Toxicon**. 39. 603-613. 2001. doi:10.1016/S0041-0101(00)00154-9.

RAYMOND, J. R.; MUKHIN, Y. V.; GELASCO, A.; TURNER, J.; COLLINSWORTH, G.; GETTYS, T. W.; GREWAL, J. S.; GARNOVSKAYA, M. N. Multiplicity of mechanisms of serotonin receptor signal transduction. **Pharmacol Ther**. 92 (2-3):179-212. 2001.

RAUCH, S. L.; SHIN, L. M.; PHELPS, E. A. Neurocircuitry models of posttraumatic stress disorder and extinction: human neuroimaging reserach-past, present and future. **Biol. Psychiatry**. 60:376-82, 2006.

RASOOLIJAZI, H.; MEHDIZADEH, M.; SOLEIMANI, M. *et al*. The effect of rosemary extract on spatial memory, learning and antioxidant enzymes activities in the hippocampus of middle-aged rats. **Med J Islam Repub Iran**. 29. 187. 2015.

REDISH, A. D. Vicarious trial and error, **Nature Reviews Neuroscience**. 17. 147-159, 2016.

REHNI, A. K.; SINGH, T. G.; BEHL, N.; ARORA, S. Possible Involvement of Ubiquitin Proteasome System and Other Proteases in Acute and Delayed Aspects of Ischemic Preconditioning of Brain in Mice. **Biol. Pharm. Bull.** v. 33, p. 1953-1957. 2010.

REICHLIN, S. Neuroendocrine-immune interactions. **N Engl J Med.** V.329, n. 17, p. 1246-1253, 1993.

RIZK, H. A.; MASOUD, M. A., MAHER O. W. Prophylactic effects of ellagic acid and rosmarinic acid on doxorubicin-induced neurotoxicity in rats. **J Biochem Mol Toxicol.** 12 (2017).doi:10.1002/jbt.21977.

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

ROZESKE, R. R.; VALERIO, S.; CHAUDUN, F.; HERRY, C. Prefrontal neuronal circuits of contextual fear conditioning. **Genes Brain Behav.** 14:22–36. 2015.

SACHARCZUK, M.; JUSZCZAK, G.; SWIERGIEL, A. H.; JASZCZAK, K.; LIPKOWSKI, A. W.; SADOWSKI, B. Alcohol reverses depressive and pronociceptive effects of chronic stress in mice with enhanced activity of the opioid system. **Acta Neurobiol. Exp.** v. 69, p. 459-468. 2009.

SAHU, A.; RAWAL, N.; PANGBURN, M. K. Inhibition of complement by covalent attachment of rosmarinic acid to activated C3b. **Biochemical Pharmacology.** 1999. 57(12), 1439–1446. doi: 10.1016/s0006-2952(99)00044-1.

SANBONGI, C., TAKANO, H., OSAKABE, N. et al., Rosmarinic acid inhibits lung injury induced by diesel exhaust particles. **Free Radic Biol Med.** 34. 1060-1069. 2003. doi: 10.1016/S0891-5849(03)00040-6.

SANTOS, U. D. **Avaliação do potencial antinociceptivo e anti-inflamatório do ácido rosmarínico.** 2013. 110 f. Tese (Doutorado em Neurociências) - Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina. 2013.

SARABI, A. *et al.* GFR alpha-1 is expressed in parvalbumin GABAergic neurons in the hippocampus. **Brain Res.** 2000. 877: 262-270.

SBARDELLOTO, G. *et al.* Transtorno de Estresse Pós-Traumático: evolução dos critérios diagnósticos e prevalência. **Psico-USF**, v. 16, n. 1, 67-73, 2011.

SCHESTATSKY, S. Historical evolution of the concept of posttraumatic stress disorders. **Rev. Bras. Psiquiatr.** 25 (Supl I): 8-11, 2003.

SHEFFLER, Z. M.; ABDIJADID, S. Antidepressants. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2019.

SHORTER, E. **A History of Psychiatry: from the era of the asylum to the age of Prozac.** New Jersey: John Wiley & Sons, 1997.

SHUMYATSKY, G. P.; MALLERET, G.; SHIN, R. M.; TAKIZAWA, S.; TULLY, K.; TSVETKOV, E.; ZAKHARENKO, S. S.; JOSEPH, J.; VRONSKAYA, S.; YIN, D.; SCHUBART, U. K.; KANDEL, E. R.; BOLSHAKOV, V. Y. Stathmin, a gene enriched in the amygdala, controls both learned and innate fear. **Cell.** v. 123, p. 697-709. 2005.

SOARES, J. C. K.; *et al.* Modelos comportamentais para o estudo da aprendizagem e memória em roedores. In: CARLINI, E. A.; MENDES, F. R. **Protocolos de Psicofarmacologia Comportamental.** São Paulo: Editora Fap-Unifesp, 2011.

SORCE, S.; KRAUSE, K. H. NOX enzymes in the central nervous system: From signaling to disease. **Antioxidants Redox Signaling**, 11, 2481–2504. 2009. doi: 10.1089/ars.2009.2578

STAHL, S. M. **Psicofarmacologia: bases neurocientíficas e aplicações práticas /** Stephen M. Stahl; tradução Patricia Lydie Voeux; revisão técnica Irismar Reis de Oliveira. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2014.

STEPANICHEV, M., DYGALO, N. N., GRIGORYAN, G., SHISHKINA, G. T., & GULYAEVA, N. Rodent Models of Depression: Neurotrophic and Neuroinflammatory Biomarkers. **BioMed Research International**, 2014, 1-20. doi:10.1155/2014/932757

SZCZYTKOWSKI, T. J. L.; LEBONVILLE, C. L.; LYSLE, D. T. Morphine prevents stress-enhanced fear learning. **Pharmacol. Biochem Behav.** v. 13. p. 672-7. 2012.

WARSHAW, M. Quality of life and dissociation in anxiety disorder patients with histories of trauma or PTSD. **American Journal of Psychiatry**, 150: 1512-1516. 1993.

TAN, K. O.; FU, N.Y.; SUKUMARAN, S. K.; CHAN, S. L.; KANG, J. H.; POON, K. L. MAP-1 is a mitochondrial effector of Bax. **Proc Natl Acad Sci USA**. 102 (41):14623–8. 2005.

THEAL, R.; TAY, V. X. P.; HICKMAN, I. J. Conflicting relationship between dietary intake and metabolic health in PTSD: A systematic review. **Nutr Res**. 54:12-22. 2018. doi: 10.1016/j.nutres.2018.03.002.

THEN, C. K.; LIU, K. H.; LIAO, M. H.; CHUNG, K. H.; WANG, J. Y.; SHEN, S. C. Antidepressants, sertraline and paroxetine, increase calcium influx and induce mitochondrial damage mediated apoptosis of astrocytes. **Oncotarget**. 14; 8(70):115490-115502. 2017.

THORNBERRY, N. A.; LAZEBNIK, Y. Caspases: enemies within. **Science**. v. 281, p. 1312-1316. 1998.

TIAN, W.; AKANDA, R.; ISLAM, A.; YANG, H. D.; LEE, S. C.; LEE, J. H.; KIM, S. K.; CHOI, Y. J.; IM, S. Y.; PARK, B. Y. The Anti-Stress Effect of *Mentha arvensis* in Immobilized Rats. **Int. J. Mol. Sci**. 19, 355; 2018. doi: 10.3390/ijms19020355

TIPPS, M. E.; RAYBUCK, J. D.; LATTAL, K. M. Substance abuse, memory, and post-traumatic stress disorder. **Neurobiol Learn Mem**. 2015. doi: 10.1016/j.nlm.2013.12.002.

VAUZOUR, D.; RODRIGUEZ-MATEOS, A.; CORONA, G.; ORUNA-CONCHA, M. J. *et al.* Polyphenols and human health: Prevention of disease and mechanisms of action. **Nutrients**. 2. 1106-1131. 2010. doi: 10.3390/nu2111106.

VAN DEN BERK-CLARK, C.; SECREST, S.; WALLS, J.; HALLBERG, E.; LUSTMAN, P. J.; SCHNEIDER, F. D.; SCHERRER, J. F. Association between posttraumatic stress disorder and lack of exercise, poor diet, obesity, and co-occurring smoking: A systematic review and meta-analysis. **Health Psychol**. 2018 May;37(5):407-416. doi: 10.1037/hea0000593.

VELAZQUEZ-MOCTEZUMA, J.; RETANA-MÁRQUEZ, S.; BONILLA-JAIME, H.; VÁZQUEZ-PALACIOS, G.; DOMÍNGUEZ-SALAZAR, E.; MARTINEZ-GARCÍA, R. Body weight gain and diurnal differences of corticosterone changes in response to acute and chronic stress in rats. **Psychoneuroendocrinology**, 28, 207-227, 2002.

VOGT, D.; ERBES, C. R.; POLUSNY, M. A. Role of social context in posttraumatic stress disorder (PTSD). **Curr Opin Psychol**. 14,138-142. 2017.

WANG, J.; XU, H.; JIANG, H. *et al.* Neurorescue effect of rosmarinic acid on 6hydroxydopamine-lesioned nigral dopamine neurons in rat model of Parkinson's disease. **J Mol Neurosci**. 47. 113-9. 2011. doi: 10.1007/s12031-0119693-1.

WEISS, N. H.; WALSH, K.; DILILLO, D. D.; MESSMAN-MOORE, T. L.; GRATZ, K. L. A Longitudinal Examination of Posttraumatic Stress Disorder Symptoms and Risky Sexual Behavior: Evaluating Emotion Dysregulation Dimensions as Mediators. **Arch Sex Behav**. 2019. 48(3):975-986. doi: 10.1007/s10508-019-1392-y.

WOODWARD, C. J. and EMERY, P. W. Determination of plasma corticosterone using high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography**, 419: 280-284, 1987.

YAN, Q.; LIU, J. P.; LI, D. W. Apoptosis in lens development and pathology. **Differentiation**. v. 74, p. 195-211. 2006.

YAO, K.; TAN, J.; GU, W. Z.; YE, P. P.; WANG, K. J. Reactive oxygen species mediates the apoptosis induced by transforming growth factor beta (2) in human lens epithelial cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** v. 354, p. 278-283. 2007.

ZHAO, M.; YU, Z.; ZHANG, Y.; HUANG, X.; HOU, J.; ZHAO, Y. *et al.* Iron-induced neuronal damage in a rat model of post-traumatic stress disorder. **Neuroscience.** 330, 90-99. 2016.

ZHANG, L.; ZHOU, R. LI, X.; URSANO, R. J.; LI, H. Stress-induced change of mitochondria membrane potential regulated by genomic and non-genomic GR signaling: a possible mechanism for hippocampus atrophy in PTSD. **Medical Hypotheses**, v. 66, p. 1205-8. 2006.

ZHANG, L. M.; *et al.* Anxiolytic effects of ketamine in animal models of posttraumatic stress disorder. **Psychopharmacology.** 232:663–672, 2015.

ZHENG, W. e WANG, S.Y. Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. **J Agric Food Chem.** 49. 5165-5170. 2001. doi:10.1021/jf010697n.

## MATERIAL SUPLEMENTAR

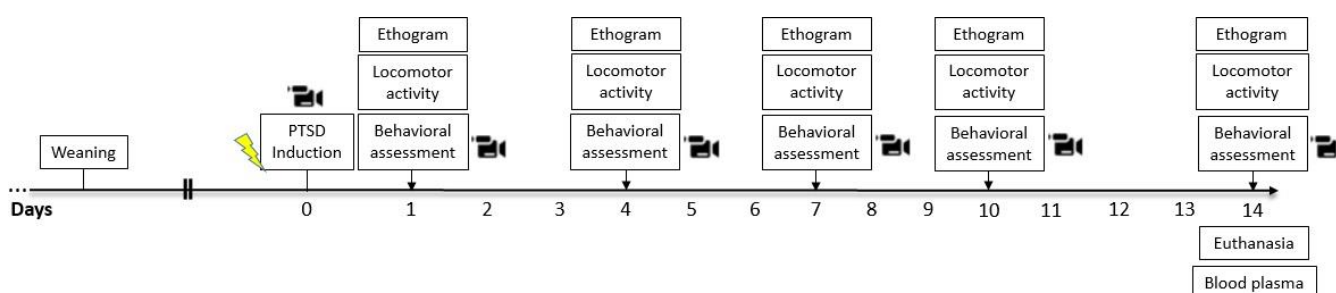
### 11 RESULTADOS

#### 11.1 ATIVIDADE LOCOMOTORA E COMPORTAMENTAL NO TEPT

Com o objetivo de avaliar a atividade locomotora, o medo e o efeito semelhante à ansiedade presentes no modelo de TEPT avaliado pelo paradigma inescapável do choque do pé, os camundongos foram submetidos a uma exposição de 3 minutos com estímulo de choque no aparelho modificado e a atividade locomotora foi avaliada pelo software Anymaze, os mesmos animais foram submetidos à avaliação dos parâmetros do etograma para avaliar o comportamento emocional.

Como mostrado na Fig. 1, a indução de TEPT foi avaliada por 14 dias, os animais foram reexpostos em 24, 96, 168, 240 e 336h após a indução traumática, então a atividade locomotora foi avaliada como mostrado na Fig. 2. Comportamento emocional relacionado a medo, como congelamento, primeiro congelamento, latência e comportamento de defecação (bolus fecal) e comportamento emocional, como ansiedade de criar / escalar e aliciar, foram avaliados e expostos na Fig. 3.

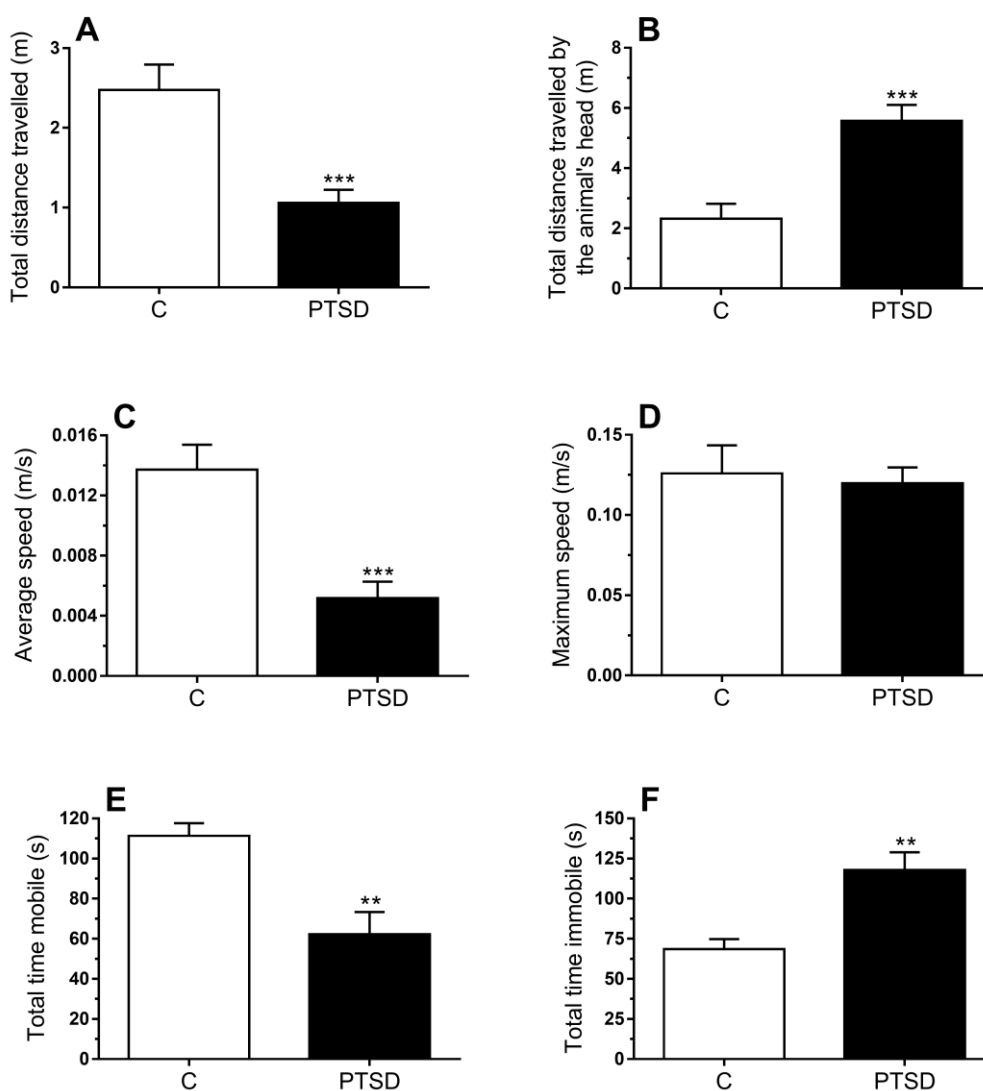
**Figura S. 1 - Delineamento experimental (experimento piloto).**



Legenda: Delineamento experimental: camundongos Swiss machos adultos foram pegos recém desmamados entre 21-30 dias após nascimento e divididos em dois grupos: controle negativo (C) e transtorno de estresse pós-traumático (TEPT). Quando os animais completaram oito semanas de idade foram submetidos ao modelo de TEPT através de choque inescapável nas patas usando o aparato *step down* modificado. Os animais foram reexpostos ao aparato 24h após o evento traumático para evocar a memória aversiva e sintomas neurovegetativos tais como medo e ansiedade, caracterizados pelo etograma de roedores. O comportamento da extinção de atividade locomotora e comportamental no TEPT foi avaliado por meio de reexposições repetitivas dos animais ao mesmo aparato 4 dias (96h), 7 dias (168h), 10 dias (240h) e 14 dias (336h) após a indução do

trauma. Os animais foram testados quanto à atividade locomotora durante à reexposição ao aparato *step down* modificado pelo software de Any-Maze. No final, os animais foram eutanasiados e microdissecadas as regiões encefálicas de interesse, assim como, o sangue colhido e o plasma sanguíneo obtido em seguida. A análise estatística dos dados foi realizada ao final da análise experimentos.

**Figura S. 2** - Atividade locomotora 24h após indução do TEPT animal.



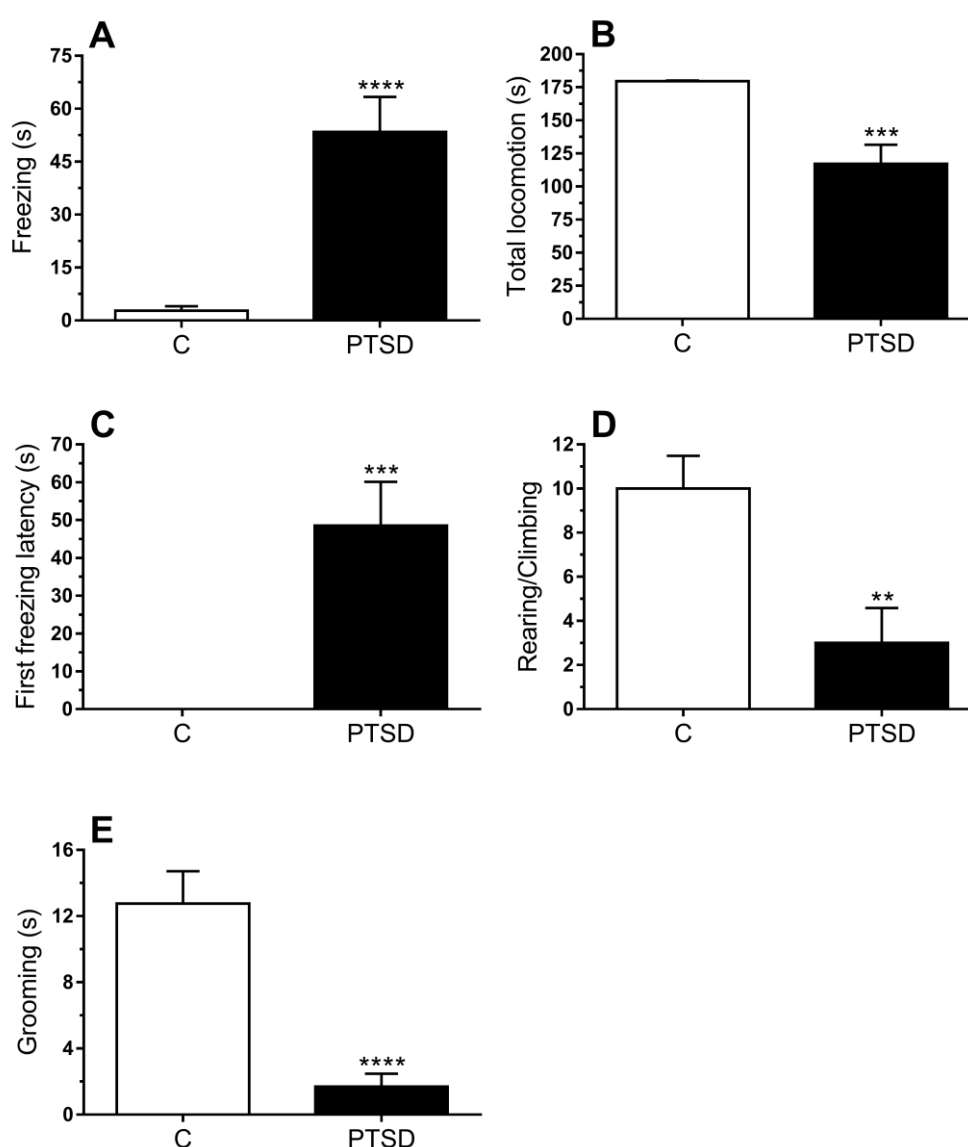
Legenda: Avaliação da atividade locomotora no modelo animal de TEPT 24h após indução da memória aversiva do trauma no aparato *step down* modificado. (C) n = 9/10; (TEPT) n = 10. Os resultados foram submetidos a análises de teste t de *Student*. Os dados são expressos como média  $\pm$  EPM. \*\* p  $\leq$  0,01, \*\*\* p  $\leq$  0,001 em comparação com o grupo controle (C).

Nesse sentido, as alterações da atividade locomotora mostradas no modelo de TEPT tanto quanto a distância total percorrida (**Fig.S 2A**), a distância total percorrida



pela cabeça do animal (**Fig.S 2B**), velocidade média (**Fig.S 2C**), velocidade máxima (**Fig.S. 2D**), tempo total móvel (**Fig.S 2E**) e tempo total imóvel (**Fig.S 2F**), o grupo TEPT evidenciou diferença estatística entre o grupo controle (C) em todos os parâmetros, exceto em velocidade máxima, mostrando que o modelo animal de TEPT não causar um prejuízo locomotor por si só. De fato, as alterações locomotoras são resultados de alterações cognitivas causadas pela evocação da memória aversiva dos animais quando submetidas novamente ao aparelho.

**Figura S. 3** - Avaliação comportamental 24h após indução do TEPT animal.



Legenda: Avaliação comportamental do modelo animal de TEPT analisado através do etograma. (C) n = 9/10; (TEPT) n = 10. Os resultados foram submetidos a análises de teste t de *Student*. Os dados estão expressos como média  $\pm$  EPM. \*\* p  $\leq$  0,01, \*\*\* p  $\leq$  0,001, \*\*\*\* p  $\leq$  0,0001 em comparação com o grupo controle (C).

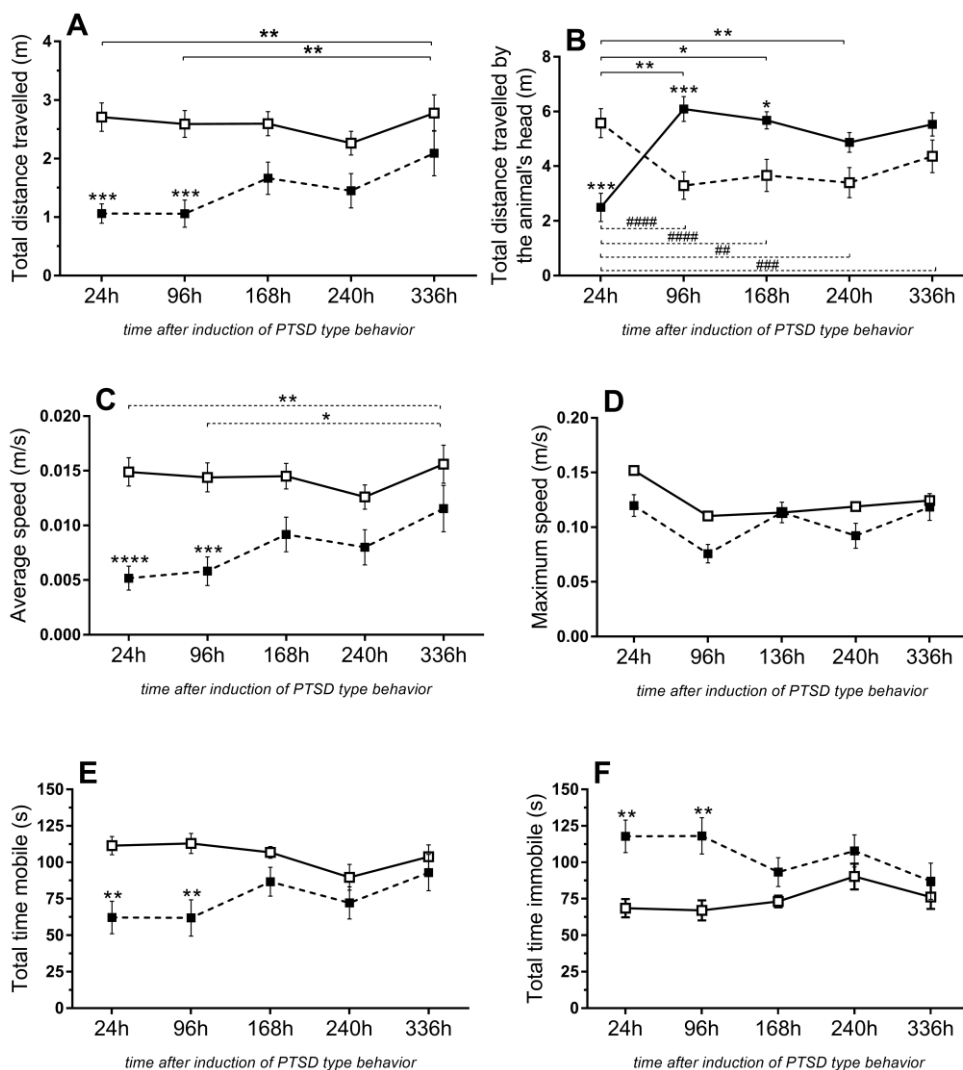
A **Fig.S. 3** mostra a atividade emocional relacionada ao medo e comportamento semelhante à ansiedade de camundongos submetidos ao paradigma do etograma. Parâmetros gerais como congelamento ou *freezing* (**Fig.S 3A**), locomoção total (**Fig.S 3B**), primeira latência de congelamento (**Fig.S 3C**), exploração vertical ou *rearing/climbing* (**Fig.S 3D**) e grooming (**Fig.S 3E**) foram avaliados e o grupo TEPT exibiu mudanças que aumentam esses medos e comportamentos semelhantes à ansiedade.

## 11.2 EXTINÇÃO DA ATIVIDADE LOCOMOTORA E COMPORTAMENTAL NO TEPT

Nas mesmas condições, as alterações da atividade locomotora mostraram-se repetidas avaliadas em outros momentos 96, 168, 240 e 336h após a indução do TEPT (**Fig. S. 4**), visando avaliar por quanto tempo as alterações da atividade locomotora poderiam ser observadas nos animais submetidos à indução da memória aversiva do TEPT.

Assim, a distância total percorrida (**Fig. S 4A**), a distância total percorrida pela cabeça do animal (**Fig. S. 4B**), a velocidade média (**Fig. S. 4C**), a velocidade máxima (**Fig. S. 4D**), o tempo total de mobilidade (**Fig. S. 4E**) e tempo total de imobilidade (**Fig. S. 4F**) observada no grupo TEPT evidenciou diferença estatística significativa entre o grupo controle (C) principalmente nas duas primeiras reexposições (24 e 96h) e já pela terceira reexposição (168h) após a indução do trauma a atividade locomotora não diferenciou-se mais do grupo C, apontando dessa forma que o melhor momento para propor algum estudo envolvendo o modelo deveria ser realizado antes do quarto dia após a indução do TEPT.

**Figura S. 4** - Avaliação da extinção de atividade locomotora no modelo de TEPT.

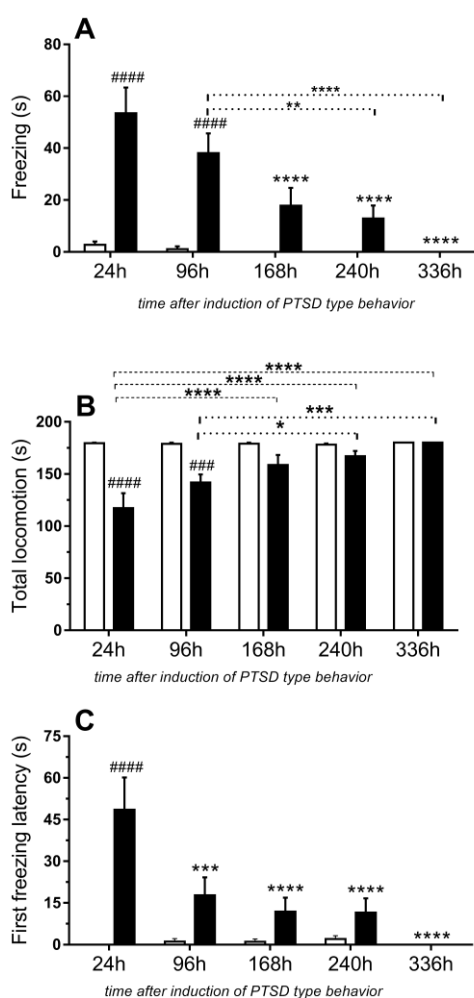


Legenda: Extinção da atividade locomotora tipo PTSD avaliada com software de labirinto. (C) = 10/11); (TEPT) n = 11. Os resultados foram submetidos a ANOVA de duas vias e *post hoc* de Bonferroni. Os dados são expressos como média  $\pm$  EPM. \*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$ , \*\*\*  $p \leq 0,001$  em relação ao grupo controle x TEPT em seu respectivo dia de reexposição ou em comparação com o grupo indicado pela marcação pontilhada. ##  $p \leq 0,01$ , ### \*\*\*  $p \leq 0,001$ , ##### \*\*\*  $p \leq 0,0001$  em comparação com o grupo indicado pela marcação pontilhada (controle 24h).

A **Fig. S. 5** mostra a avaliação de atividade comportamental relacionada ao medo e ansiedade dos animais submetidos a avaliação através do etograma. Alguns parâmetros como congelamento ou *freezing* (**Fig. S. 5A**), 24h  $p \leq 0,0001$ , 96h  $p \leq 0,0001$ , 168h  $p = 0,0514$ , 240h  $p = 0,3046$  e 336h  $p > 0,9999$ ; locomoção total (**Fig. S. 5B**), 24h  $p \leq 0,0001$ , 96h  $p = 0,0003$ , 168h  $p = 0,1133$ , 240h e 336h  $p > 0,9999$ ; latência de primeiro *freezing* (**Fig. S. 5C**), 24h  $p \leq 0,0001$ , 96h  $p = 0,0799$ , 168h  $p = 0,5591$ , 240h  $p = 0,8176$  e 336h  $p > 0,9999$ , foram avaliados e o grupo TEPT exibiu

mudanças apresentando os comportamentos de medo nas duas primeiras reexposições 24 e 96h, mas não na latência de primeiro *freezing* que mostrou apenas diferença do grupo controle (C) na primeira reexposição inócua 24h após a exposição traumática no aparato *step down* modificado, não sendo relevante estatisticamente a partir da reexposição de 96h ( $p = 0,0799$ ). Tal redução progressiva do comportamento de *freezing* representada na **Fig. S. 5** traduz a ideia de que a cada vez que os animais são reexpostos ao aparato, o comportamento de *freezing* perde mais intensidade, paulatinamente até sua total extinção.

**Figura S. 5** - Avaliação da extinção do comportamento do modelo de TEPT.



Legenda: Extinção do modelo animal de TEPT comportamental avaliado pelo paradigma do etograma. (C)  $n = 11$ ; (TEPT)  $n = 11$ . Os resultados foram submetidos a ANOVA de duas vias e *post hoc* de Bonferroni. Os dados estão expressos como média  $\pm$  EPM. ####  $p \leq 0,0001$  em comparação com o grupo controle 24h e \*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$ , \*\*\*  $p \leq 0,001$ , \*\*\*\*  $p \leq 0,0001$  em comparação com o grupo TEPT 24h ou em comparação com o grupo indicado pela marcação pontilhada.

Após a realização do experimento piloto e análise dos dados ficou convencionado que os experimentos seguintes envolvendo estudo comportamental com tratamentos englobando os demais grupos experimentais baseariam-se na fixação do tempo de análise 24h após a indução do modelo animal de TEPT, abarcando de tal maneira todos os sintomas tipo TEPT de medo e ansiedade. Esse tempo se estenderia até 48h apenas para avaliações bioquímicas para averiguar a liberação e secreção de corticosterona pelo eixo HHA.



## ANEXO II - Etograma murino

### Etograma murino na ausência ou presença de eletroestimulação nas patas

Inventário ou lista de comportamentos usados pela etologia (disciplina que estuda o **comportamento animal**) para descrever tendências ambientais em determinadas espécies. Deve ser objetivo para evitar interpretações ou "ruídos" subjetivos, respeitando a lei da replicabilidade científica.

- Autolimpeza (*grooming*) - Manipulação repetitiva dos pêlos da cabeça, tronco e genitais usando as patas dianteiras ou a boca (comportamentos autodirigidos).
- Olfacção - Exploração olfativa do ambiente indicada pelo movimento das narinas e das vibrissas e movimentos pendulares da cabeça em posição elevada.
- Esquadrinhar - Exploração visuomotora do ambiente caracterizada por movimentos laterais da cabeça, geralmente, acompanhados de olfacção.
- Avaliação de risco - Exploração do ambiente com breves alongamentos do tronco (*stretch-attending*), olfacção e esquadrinhamento.
- Levantar (*rearing*) - Postura ereta, com extensão das patas posteriores ou quando realizado apoiando duas patas nas paredes (*climbing*).
- Locomoção - Deslocamento lento do animal por, pelo menos, dois espaços do assoalho da arena, mediante a projeção simultânea das patas contralaterais anterior e posterior.
- *Freezing* (congelamento) ou Imobilidade tensa - Cessar brusco de todos os movimentos, frequentemente acompanhado de extensão dos membros (elevação do tronco), orelhas e pescoço e, às vezes, da cauda, indicando o aumento do tônus muscular. O cessar brusco das atividades pode resultar em posturas anômalas.
- Micção - Eliminação de urina durante vários comportamentos e intensamente presente durante na indução de modelos de traumas.
- Defecação - Eliminação de fezes durante vários comportamentos, comum na marcação de territorialidade. No teste do LCE, roedores machos podem, também, apresentar comportamentos relacionados ao medo, em maior intensidade do que as fêmeas como baixa taxa de ambulação e altos níveis de defecação no teste da arena, assim como número reduzido de entradas nos braços abertos do LCE (Johnston e File, 1991).
- Dormir - Postura horizontal com olhos fechados, sem atividade olfativa, e com relaxamento muscular indicado pelo rebaixamento do tronco, cabeça e pescoço e pela flexão dos membros.
- Repouso - Postura horizontal com olhos semiabertos ou abertos, atividade olfativa reduzida e relaxamento muscular indicado pelo rebaixamento do tronco e pela flexão dos membros. Roedores (ratos) podem apresentar uma postura de "esfinge", com o tronco rebaixado e pescoço e cabeça erguidos.
- Vocalização - Emissão sonora mediante presas, predadores, manuseio humano, administração de drogas, comunicação entre os animais e comum na indução de modelo de traumas, geralmente acompanhado com tentativa de fuga.

## ANEXO III - Certificado de Aprovação no CEUA:



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA



### CERTIFICATE

We certify that the Protocol 18/2017 related to research project entitled "Evaluation of the neuroprotective potential of rosmarinic acid in murine model of Post-Traumatic Stress Disorder(PTSD)", under responsibility of Cristina Martins e Silva, is in accordance with the ethical principles of animal experimentation adopted by this Ethics Committee on Animal Use (CEUA-UFES), being approved at the regular assembly in October 06, 2017.

Vitória (ES), October 06, 2017.

Prof. Roger Lyrio dos Santos  
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais  
CEUA/CCS/UFES