

Thaís Ferreira de Barros

AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL E BIOQUÍMICA DO EFEITO
DO EXTRATO DE *Polygala paniculata* NA NEUROINFLAMAÇÃO
INDUZIDA PELO MODELO DE TRANSTORNO DE ESTRESSE
PÓS-TRAUMÁTICO EM CAMUNDONGOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Neurociências da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Neurociências.

Orientador: Prof. Dr. Adair Roberto Soares Santos

FLORIANÓPOLIS

2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Barros, Thaís Ferreira de
AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL E BIOQUÍMICA DO EFEITO DO
EXTRATO DE *Polygala paniculata* NA NEUROINFLAMAÇÃO INDUZIDA
PELO MODELO DE TRANSTORNO DE ESTRESSE PÓS-TRAUMÁTICO EM
CAMUNDONGOS / Thaís Ferreira de Barros ; orientador,
Adair Roberto Soares dos Santos - Florianópolis, SC, 2016.
115 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós
Graduação em Neurociências.

Inclui referências

1. Neurociências. 2. Planta Medicinal. 3. Transtorno de
Estresse Pós-Traumático. 4. Ansiedade. 5. Depressão. I.
Santos , Adair Roberto Soares dos. II. Universidade
Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em
Neurociências. III. Título.

THAÍS FERREIRA DE BARROS

**“AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL E BIOQUÍMICA
DO EFEITO DO EXTRATO DE *Polygala paniculata* NA
NEUROINFLAMAÇÃO INDUZIDA PELO MODELO DE
TRANSTORNO DE ESTRESSE PÓS-TRAUMÁTICO EM
CAMUNDONGOS”**

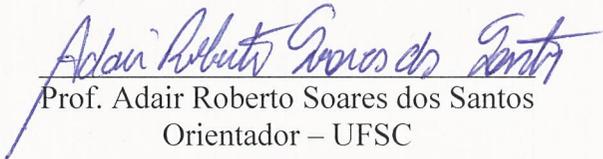
Esta dissertação foi julgada e aprovada para a obtenção do Grau de Mestre em Neurociências na área de Neuropsicobiologia no Programa de Pós-Graduação em Neurociências da Universidade Federal de Santa Catarina

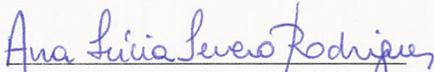
Florianópolis, 06 de maio de 2016.


Prof. Adair Roberto Soares dos Santos

Coordenador do Curso

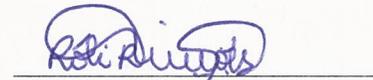
Banca Examinadora:


Prof. Adair Roberto Soares dos Santos
Orientador – UFSC


Prof. Ana Lúcia S. Rodrigues
Membro - UFSC


Prof. Eduardo L. G. Moreira
Membro - UFSC


Prof. Marcelo L. Schwarzbald
Membro externo ao Programa


Dra. Róli Rodrigues Simões
Membro suplente

À minha mãe, Conceição e minha irmã, Alice.

As razões de tudo.

AGRADECIMENTOS

À minha mãe Conceição, e minha irmã Alice, por todo amor, incentivo e apoio ao longo de todo esse tempo, por compreenderem minha ausência e minhas buscas e por serem sempre a minha motivação em ir cada vez mais longe.

Ao Prof. Adair, por ter aberto as portas de seu laboratório e por ter acreditado em mim, quando eu muitas vezes não acreditava. Agradeço pelos conselhos, puxões de orelha, incentivo, paciência, por todo o aprendizado proporcionado e por ter me mostrado, como a ciência e a pesquisa são fascinantes. O meu mais sincero obrigada!

Ao meu tio Luiz, por toda a ajuda em todos os momentos que precisei e por ser um exemplo de dedicação e profissionalismo.

À Marta e Silmar, que mesmo distantes, sempre me ajudaram e incentivaram desde o começo desta jornada.

Ao professor Moacir G. Pizzolatti e seus alunos, pela preparação do extrato.

À professora Cristina Martins e Silva e seus alunos, pela realização das análises de PCR.

À CAPES, pelo apoio financeiro.

À Carol, por todos os conselhos, incentivo, conversas e confiança ao longo desse tempo. Por ver em mim capacidades que eu já não era capaz de enxergar e por me fazer acreditar no meu potencial. Muito obrigada por tudo!

Ao Igor, sem o qual, este trabalho não teria sido possível. Obrigada pelas nossas conversas, discussões, por sua ajuda em todos os momentos que precisei, por toda a ajuda na parte estatística deste trabalho, pelas elucidações, por me fazer enxergar as coisas sob outros pontos de vista. Obrigada até mesmo pela constante zoeira, que sempre me fez dar gargalhadas, mesmo em momentos de desespero. Fostes, com certeza, uma das pessoas mais queridas e importantes para mim na pós-graduação.

Dizem que não há amor na pós-graduação e eu não poderia discordar mais. Ninguém caminha sozinho, ninguém se mantém de pé por muito tempo sozinho. São os amigos que fazemos ao longo da vida que dão cor e sentido a ela e a tornam realmente completa. Tenho muito orgulho de ter feito parte do LANDI e sou extremamente grata às tantas pessoas maravilhosas que conheci na pós e que levarei sempre comigo, na memória e no coração. Só tenho a agradecer aos meus parceiros e amigos de laboratório, por todos os momentos compartilhados, por todas as conversas, risadas, cafés e principalmente, por toda a parceria, que

sempre foi muito grande e que fez toda a diferença ao longo desse tempo. Fernanda (a pessoa mais Diver!), Ana, Marina, Fernando, Murilo, Rosane, Aledson, Cláudia, Scheila, Holly, Dani, Léo, Fran, Stella, Glauce (Crente), Well (a cria de Capiroto mais feliz e carente do mundo, que eu tanto amo!), Lari, enfim, a todos do LANDI, que por serem muitos, se torna impossível citar todos. Aos parceiros do LIDOC, Amândinha, Thayzinha, Henver e todos os demais. Muito obrigada por tudo!

À Dona Vilma, pelos cafés, pelos excelentes conselhos e por ser sempre tão querida e prestativa com todos nós. Seu Carlinhos, pela alegria contagiante e constante bom humor. E especialmente ao Nivaldo, sempre tão prestativo e eficiente em nos ajudar e sem o qual, estaríamos perdidos.

Ao Jhônatas, meu parceiro de trilhas, viagens e nesse tempo final, de moradia também, que a pós me proporcionou conhecer. Obrigada pela parceria em explorar o que Floripa e o Sul têm de melhor e mais belo e por ter me proporcionado tantos bons momentos, que fizeram desse tempo em Floripa, com certeza, um dos melhores de minha vida. Valeu por tudo, Jhô!

À Anamaria, que em tão pouco tempo se tornou tão querida e especial em minha vida. Obrigada pelas boas conversas, pela parceria nas trilhas e nas viagens e por todos os momentos lindos que partilhamos.

Ao Pedro, que me recebeu de braços abertos em Floripa e à Larisse, que me ajudou e incentivou tanto no começo dessa jornada, quando tudo ainda era incerto.

Aos camundongos utilizados, todo o meu respeito e profundo agradecimento.

Enfim, deixo aqui o meu mais profundo e sincero obrigada a todos aqueles que pegaram junto, até o final!! (Piada interna que só os Landianos entenderão...)

“Os grandes acontecimentos do mundo acontecem no cérebro. Também é no cérebro, e só nele, que ocorrem os grandes pecados do mundo”.
Oscar Wilde

“Como um aprendiz, você deve estar preparado para enfrentar as dificuldades que estão associadas a toda busca genuína e estar determinado a persistir em seus esforços e sua vontade. Você deve tentar prever os obstáculos que forçosamente encontrará ao longo do caminho e compreender que a chave para a prática bem-sucedida é nunca abandonar sua determinação”.
(Dalai Lama, 2001)

RESUMO

O Transtorno de Estresse Pós-Traumático (TEPT) é um grave e incapacitante transtorno de ansiedade, que alguns indivíduos apresentam após a exposição a um evento traumático. Sem possuir tratamento específico, o recomendado atualmente é a combinação do inibidor seletivo de recaptção de serotonina (ISRS) sertralina e a Terapia Comportamental Cognitiva (TCC). No entanto, estes não chegam a alcançar 50% de remissão dos sintomas. Devido a esse fator, a busca por novas e eficazes formas de tratamento se mostra de grande relevância. Dentre elas, a utilização de plantas medicinais parece ser interessante devido ao seu uso no tratamento e prevenção de doenças ser realizado desde a antiguidade, sendo esse uso mantido até os dias atuais, por uma expressiva parcela da população. Entre as diversas plantas utilizadas, encontra-se a *Polygala paniculata*, conhecida popularmente como “barba-de-São João e mimosinha”. Estudos anteriores indicam que seu extrato hidroalcoólico possui efeito analgésico, anti-inflamatório, antidepressivo e neuroprotetor por inibir a ação de citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e a interleucina um beta (IL-1 β), as quais contribuem na neuroinflamação, presente em doenças neuropsiquiátricas tais como Esquizofrenia, Depressão Maior e o TEPT. Assim, o presente trabalho pretende investigar o possível efeito do extrato hidroalcoólico da *Polygala paniculata* (EHPp) no modelo animal de TEPT, bem como o seu mecanismo de ação neurobiológico em camundongos fêmeas. A administração do EHPp (0,1-1,0 mg/kg) por via intragástrica (i.g.) em camundongos, trinta minutos após passarem por um protocolo de indução de TEPT (choque inescapável nas patas) mostrou ser capaz de reduzir, dependente da dose, o tempo de *freezing* destes animais, quando reexpostos ao aparato de choque, vinte e quatro horas depois. O EHPp (0,1 mg/kg, i.g.) e a sertralina (15 mg/kg, i.g.) foram capazes de reduzir o tempo de latência dos animais para saírem do estado de *freezing* e o EHPp foi capaz de prevenir a redução do comportamento de *grooming*, provocada pelo estresse gerado. Além disto, o EHPp (0,1 mg/kg, i.g.) foi capaz de reduzir o estado tipo depressivo associado ao TEPT no teste do nado forçado, caracterizado pelo aumento de imobilidade dos animais. O EHPp (0,1 mg/kg, i.g.) preveniu o aumento da expressão gênica do RNAm de TNF- α no hipotálamo, córtex pré-frontal (CPF) e hipocampo dos animais com TEPT, todavia, a prevenção do aumento da expressão de IL-1 β foi demonstrada apenas no hipocampo. Por outro lado, o EHPp (0,1 mg/kg, i.g.) preveniu o aumento da expressão gênica do RNAm de

GDNF no hipotálamo, CPF e hipotálamo, enquanto que o aumento da expressão do RNAm de BDNF foi prevenido no hipotálamo e CPF. Além disto, o efeito do EHPP (0,1 mg/kg, i.g.) foi independente de uma ação amnésica quando avaliado no teste da esQUIVA inibitória, sugerindo que seu efeito parece ser específico. Em conjunto, os dados deste trabalho demonstram que o EHPP apresenta importante efeito promissor no tratamento da neuroinflamação associado ao transtorno de estresse pós-traumático.

Palavras chave: Transtorno de Estresse Pós-Traumático, *Polygala paniculata*, depressão, neuroinflamação, neurotrofinas, citocinas pró-inflamatórias, plantas medicinais.

ABSTRACT

The post-traumatic stress disorder (PTSD) is a severe and disabling anxiety disorder, which some individuals present after exposure to a traumatic event. Without possessing specific treatment, the currently recommended is the combination of selective serotonin reuptake inhibitor (SSRI) sertraline and Cognitive Behavioral Therapy (CBT). However, these are not enough to achieve 50% remission of symptoms. Due to this factor, the search for new and effective approaches is of great relevance. Among these, the use of medicinal plants seems interesting due to its application in the treatment and prevention of diseases be known since old ages, and is beneficial until the present days, by a significant portion of the population. Among the various plants used is *Polygala paniculata*, popularly known as "barba-de-São João e mimosinha". Previous studies indicate that its hydroalcoholic extract possesses analgesic, anti-inflammatory, antidepressant, and neuroprotective by inhibiting the action of pro-inflammatory cytokines, such as tumor necrosis factor alpha (TNF- α) and interleukin 1 beta (IL-1 β), which contribute to the neuroinflammation, existent in neuropsychiatric diseases such as Schizophrenia, Major Depression and PTSD. Thus, the present study aims to investigate the possible effect of hydroalcoholic extract of *Polygala paniculata* (HEPp) in the animal model of PTSD, as well as its mechanism of neurobiology action in female mice. HEPp Administration (0.1-1.0 mg/kg, i.g.), thirty minutes after going through a protocol of PTSD induction (inescapable shock on his paws) proved to be capable of reducing the dose-dependent time of freezing of these animals, when re-exposed to the shock apparatus, 24 hours later. The HEPp (0.1 mg/kg, i.g.) and sertraline (15 mg/kg, i.g.) were able to reduce the latency of the animals to leave the state of freezing and prevent the reduction of the grooming behavior, caused by stress generated. In addition, the HEPp (0.1 mg/kg, i.g.) was able to reduce the depressive-like behavior associated with PTSD in the forced swimming test, characterized by the increase of immobility. The HEPp (0.1 mg/kg, i.g.) prevented the increase in gene expression of the TNF- α RNAm in the hypothalamus, prefrontal cortex (CPF) and hippocampus of animals with PTSD, however, prevention of the increase of the expression of IL-1 β has been demonstrated only in the hippocampus. On the other hand, the HEPp (0.1 mg/kg, i.g.) prevented the increase in gene expression of RNAm to GDNF in the hypothalamus, CPF and hypothalamus, while the increase of RNAm expression to BDNF was prevented in the hypothalamus and CPF. In addition, the HEPp effect (0.1 mg/kg, i.g.) was independent of an amnesic action when evaluated in

the inhibitory avoidance test, suggesting that its effect seems to be specific. Together, the data of this study demonstrate that the HEPp presents important promising effect in the treatment of neuroinflammation associated with post-traumatic stress disorder.

Key words: Post-traumatic Stress Disorder, *Polygala paniculata*, depression, neuroinflammation, neurotrophin, cytokines pro-inflammatory, medicinal plants.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquematisação do processo de estresse.....	25
Figura 2: Alterações funcionais de estruturas límbicas e do Eixo HPA no TEPT, com conseqüente aumento de citocinas pró-inflamatórias.....	32
Figura 3: Exemplares de <i>Polygala paniculata</i>	45
Figura 4: Estrutura química dos compostos cumarina, rutina e xantona respectivamente, encontrados no EHPP	47
Figura 5. Representação do animal no aparato de Esquiva Inibitória, adaptado para a realização dos experimentos de choque inescapável nas patas.....	56
Figura 6: Sequência dos procedimentos realizados, desde a indução do TEPT até o tratamento dos animais.....	57
Figura 7: Comportamento de <i>grooming</i> em animal reexposto ao aparato de choque.....	60
Figura 8 Comportamento de <i>rearing</i> em animal reexposto ao aparato de choque.....	61
Figura 9 Escore utilizado para mensuração da posição da orelha.....	61
Figura 10: Animal na plataforma do aparato de Esquiva Inibitória.....	63
Figura 11: Influência das reexposições ao aparato, no comportamento de <i>freezing</i> , na primeira reexposição após os choques.....	67
Figura 12: Influência das reexposições ao aparato, nos comportamentos de <i>rearing</i> e <i>grooming</i> , na primeira reexposição após os choques.....	68
Figura 13: Decurso temporal do comportamento de <i>freezing</i> pós choque.....	69
Figura 14: Influência das reexposições ao aparato, no comportamento de <i>freezing</i>	70
Figura 15: Efeito do EHPP na resposta comportamental dos animais, 24h após serem submetidos ao protocolo de TEPT.....	71
Figura 16: Efeito do EHPP ou sertralina, na resposta comportamental de latência e <i>freezing</i> dos animais, 24h após serem submetidos ao protocolo de TEPT.....	72
Figura 17: Efeito do EHPP ou sertralina, na resposta comportamental de <i>grooming</i> e <i>rearing</i> dos animais, 24h após serem submetidos ao protocolo de TEPT.....	73
Figura 18: Efeito do EHPP ou sertralina, na resposta comportamental de posição da orelha dos animais, 24h após serem submetidos ao protocolo de TEPT.....	74
Figura 19: Animais reexpostos ao aparato, 24h após passarem pelo protocolo de TEPT.....	75

Figura 20: Alterações comportamentais induzidas pelos choques nos animais no teste do nado forçado.....	76
Figura 21: Efeito do EHPp ou sertralina, no comportamento de imobilidade dos animais no teste do nado forçado, 24h após serem submetidos ao protocolo de TEPT.....	77
Figura 22: Efeito do EHPp, sertralina ou salina, no teste de esQUIVA inibitória.....	78
Figura 23: Efeito do EHPp sobre a expressão do RNAm de BDNF, GDNF, TNF- α e IL-1 β (D) no hipotálamo de camundongos com ou sem TEPT.....	80
Figura 24: Efeito do EHPp sobre a expressão do RNAm de BDNF, GDNF, TNF- α e IL-1 β no córtex pré-frontal de camundongos com ou sem TEPT.....	81
Figura 25: Efeito do EHPp sobre a expressão do RNAm de BDNF, GDNF, TNF- α e IL-1 β no hipocampo de camundongos com ou sem TEPT.....	82

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Especificação dos grupos de animais usados na parte experimental do presente estudo e seus respectivos tratamentos.....	48
Tabela 2: Genes para a análise por PCR quantitativo em tempo real e seus primers e tamanho do fragmento.....	54

LISTA DE SIGLAS

ACTH	Hormônio Adrenocorticotrópico (do inglês <i>adrenocorticotropic hormone</i>)
APA	<i>The American Psychological Association</i>
BDNF	Fator Derivado do cérebro (do inglês <i>brain-derived neurotrophic fator</i>)
BLA	Amígdala Basolateral
CCA	córtex cingulado anterior
CEUA	Comissão de Ética para o Uso de Animais
DMSO	Dimetilsulfóxido
CPF	córtex pré-frontal
CPFm	córtex pré-frontal medial
CRH	Hormônio liberador de corticotropina (do inglês <i>corticotropin releasing hormone</i>)
D1	Receptor dopaminérgico D1
D2	Receptor dopaminérgico D2
EHPp	Extrato Hidroalcoólico de <i>Polygala paniculata</i>
E.P.M.	Erro padrão da média
EUA	Estados Unidos da América
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GDNF	Fator derivado da glia (do inglês <i>glial cell line-derived neurotrophic fator</i>)
HPA	Eixo Hipotálamo-Pituitária-Adrenal
i.g.	intra gástrica
IL-1α	Interleucina-1 alfa
IL-1β	Interleucina-1 beta
IMAO	inibidores da monoamina oxidase
ISRS	inibidores seletivos da recaptção de serotonina
ISRN	inibidores seletivos da recaptção de noradrenalina
LANDI	Laboratório de Neurobiologia da Dor e Inflamação
mA	Miliampére
NMDA	N-metil-D-aspartato
NCS	<i>National Comorbidity Survey</i>
PCR	Reação em cadeia da polimerase (do inglês <i>Polymerase Chain Reaction</i>)
REM	Movimento rápido dos olhos (do inglês <i>rapid eye movement</i>)
RNA	Ácido ribonucleico (do inglês <i>ribonucleic acid</i>)
RNA_m	Ácido ribonucleico mensageiro (do inglês <i>messenger ribonucleic acid</i>)

SUS	Sistema Único de Saúde
SNC	Sistema Nervoso Central
TCAs	Antidepressivos tricíclicos
TCC	Terapia Comportamental Cognitiva
TEPT	Transtorno de Estresse Pós-Traumático
TNF-α	Fator de necrose tumoral – alfa
UFSC	Universidade Federal de Santa Catarina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	23
1.1	ESTRESSE	23
1.2	TRANSTORNO DE ESTRESSE PÓS-TRAUMÁTICO - TEPT	26
1.3	FISIOPATOLOGIA DO TEPT	29
1.4	NEUROINFLAMAÇÃO	33
1.4.1	Citocinas	33
1.4.2	Fatores neurotróficos	35
1.5	MODELOS ANIMAIS DE TRANSTORNO DE ESTRESSE PÓS-TRAUMÁTICO (TEPT)	37
1.6	TRATAMENTO.....	40
2	PLANTAS MEDICINAIS	43
2.1	<i>Polygala paniculata</i>	45
3	JUSTIFICATIVA	51
4	OBJETIVOS	53
4.1	GERAL:.....	53
4.2	ESPECÍFICOS:.....	53
5.	MATERIAIS E MÉTODOS	55
5.1	ANIMAIS	55
5.2	INDUÇÃO DO MODELO DE TRANSTORNO DE ESTRESSE PÓS-TRAUMÁTICO.....	55
5.3	DROGAS E TRATAMENTO	56
5.4	AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL.....	58
5.4.1	Medo e Ansiedade	59
5.4.1.1	<i>Freezing</i>	59
5.4.1.2	Latência de movimento	59
5.4.1.3	<i>Grooming</i>	60

5.4.1.4 Rearing.....	60
5.4.1.5 Ear position.....	61
5.4.2 Avaliação Comportamental tipo Depressão.....	62
5.4.2.1 Teste do Nado Forçado	62
5.4.3 Avaliação da memória aversiva	62
5.4.3.1 Esquiva inibitória.....	62
5.5 AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA “EX VIVO”	63
5.5.1 PCR Quantitativo em Tempo Real.....	64
5.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA	65
6 RESULTADOS.....	67
6.1 Avaliação do comportamento de medo e ansiedade	67
6.2 Efeito do EHPp e da sertralina no comportamento de medo e ansiedade dos animais submetido ao TEPT	70
6.3 Efeito do EHPp e da sertralina no comportamento tipo depressivo dos animais submetido ao TEPT.....	75
6.4 Efeito do EHPp e da sertralina na memória aversiva (Esquiva inibitória)	77
6.5 AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA “EX VIVO”.....	79
6.5.1 Efeito do modelo de TEPT e do EHPp na expressão do RNAm de BDNF, GDNF, IL-1 β e TNF- α no Hipotálamo	79
6.5.2 Efeito do modelo de TEPT e do EHPp na expressão do RNAm de BDNF, GDNF, IL-1 β e TNF- α no Córtex Pré-Frontal	80
6.5.3 Efeito do modelo de TEPT e do EHPp na expressão do RNAm de BDNF, GDNF, IL-1 β e TNF- α no Hipocampo.....	81
7 DISCUSSÃO	83
8 CONCLUSÃO	93
REFERÊNCIAS.....	95

1 INTRODUÇÃO

1.1 ESTRESSE

Derivada do latim, a palavra “*stress*”, desde o século XVIII, é utilizada pela física para designar a ação de uma força ou pressão externa que deforma ou rompe o equilíbrio de um sistema. Adotada pela biologia, tal terminologia, passou a ser utilizada a partir da década de 30, na definição das alterações que os organismos de seres vivos, vertebrados e invertebrados, sofriam quando, em função da ação de um agente, saíam de seu estado de homeostase e passavam a apresentar estados fora de seu equilíbrio natural (FARIAS, 1985).

Tais alterações foram observadas inicialmente por Cannon (1926), mas foi o fisiologista Hans Selye, em seus estudos em 1935, que utilizou pela primeira vez a denominação estresse para esses estados (MORAES, 2010). Desse modo, estresse passou a ser entendido, dentro do campo de estudo da biologia, como a resposta resultante de uma ação com potencial de provocar alterações no equilíbrio natural de um organismo (FARIAS, 1985).

Apesar de se referir a estados fora da homeostase, o estresse é essencial para a manutenção da vida e sobrevivência das espécies. Seres vivos, sejam vertebrados ou invertebrados, estão constantemente expostos a situações que podem comprometer tanto a sua segurança quanto a sua sobrevivência (exposição ao frio ou calor intenso, predadores, animais dominantes da mesma espécie, desastres naturais, entre outros) (MORAES, 2010). São as reações de estresse, portanto, que lhes proporcionam meios de responderem de forma rápida e condizente com a situação, aumentando as chances de adaptação e sobrevivência. Desse modo, quando se encontram em situações de ameaça, seres vivos podem apresentar diferentes respostas, que são possíveis através da ocorrência de uma série de alterações fisiológicas preparatórias. Essas respostas podem ser do tipo ativas, as chamadas respostas de “luta ou fuga”, ou passivas, caracterizadas por comportamentos de imobilidade (MORAES, 2010).

Usualmente desencadeadas na presença de um estressor ou ameaça controlável ou passível de escape, as estratégias ativas envolvem aumento da atividade sensorio-motora com mudanças circulatórias, que incluem aumento da pressão arterial, frequência cardíaca e respiratória, aumentando a disponibilidade de sangue em áreas com maior necessidade metabólica, tais como membros superiores e inferiores (VALENTE et al.,

2008). As estratégias passivas, por sua vez, são ativadas quando a ameaça é incontrollável ou sem possibilidade de escape. Neste caso, seres vivos apresentam redução da atividade motora (imobilidade), da vigilância, reatividade, diminuição da pressão arterial e bradicardia (VALENTE et al., 2008). Em animais, este comportamento é denominado “freezing”, ou congelamento, fazendo com que o animal se torne menos perceptível possível ao agente estressor.

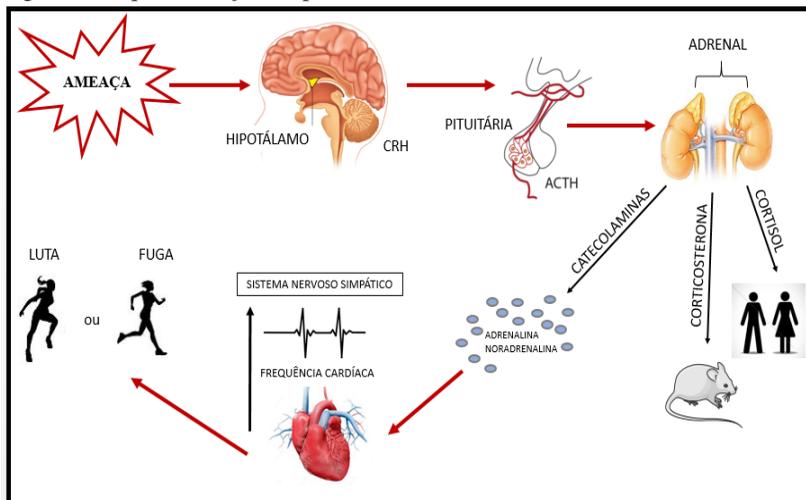
São várias as áreas cerebrais que estão envolvidas nestas respostas, mas em especial, destaca-se o eixo Hipotálamo-Pituitária-Adrenal (eixo HPA). Quando há a detecção de uma ameaça, ocorre o desencadeamento de reações emocionais e ativação no sistema límbico, que através de conexões com o hipotálamo, promove a ativação do eixo HPA (MORRIS, COMPAS, GARBER, 2012). Quando este eixo é ativado, ocorre a liberação do hormônio liberador de corticotropina – CRH (do inglês *corticotropin releasing hormone*) através dos neurônios do núcleo paraventricular (PVN) do hipotálamo. O CRH promove a liberação na corrente sanguínea do hormônio adrenocorticotrópico – ACTH (do inglês *adrenocorticotropic hormone*) pela adeno-hipófise, na parte anterior da hipófise, também chamada de pituitária. O ACTH, por sua vez, atua no córtex da glândula adrenal, localizada na parte superior dos rins, e promove a liberação de glicocorticóides (cortisol em humanos e corticosterona em roedores), das catecolaminas (adrenalina e noradrenalina) e neuropeptídeos, em especial opióides endógenos (Fig. 1) (DANTZER, 2009). A estimulação desse eixo também resulta na ativação de regiões específicas do cérebro, como o hipocampo, amígdala e córtex pré-frontal, que são dotadas de grande número de receptores de glicocorticóides (GRS) (DEPPERMAN et al., 2014).

A ativação do eixo HPA promove a ativação do sistema nervoso simpático, com aumento, portanto, da frequência cardíaca e da pressão arterial, vasodilatação dos vasos sanguíneos dos músculos dos membros superiores e inferiores, de modo a lhes conferir maior disponibilidade energética, vasoconstrição dos vasos da pele, dilatação da pupila, entre outras alterações (DEPPERMAN et al., 2014). Estas alterações ocorrem para que haja maior disponibilidade de energia nas áreas necessárias para a ação de luta ou fuga (Fig. 1). Com a redução do estímulo de estresse, estas respostas vão sendo reduzidas, até que o organismo volte ao seu estado basal.

A redução completa da resposta de estresse ocorre através de *feedback* negativo, em que o cortisol liberado pelas adrenais atua inibindo a liberação de CRH no hipotálamo, que por sua vez, inibe a liberação de

ACTH na pituitária, resultando na inibição de síntese e liberação de glicocorticoides na adrenal (Fig. 1).

Figura 1: Esquemática do processo de estresse.



Fonte: Imagem elaborada pela autora.

Em indivíduos saudáveis, após a retirada do agente estressor, o organismo tende a voltar aos poucos ao seu estado de homeostase e a memória traumática, referente ao evento estressante, integrada às demais memórias, proporcionando assim maior habilidade e repertório para responder ou evitar situações semelhantes no futuro (VALENTE et al., 2008). Essas são as chamadas respostas adaptativas. No entanto, alguns organismos podem apresentar respostas incongruentes, que resultam em um estado constante de hiperexcitação e falha da integração da memória traumática, o que faz com que a resposta de estresse permaneça, mesmo que a ameaça já não esteja mais presente. Quando isso ocorre, o estresse passa a ser nocivo, acarretando implicações fisiológicas, que resultam em danos físicos e emocionais ao organismo, sendo estas consideradas como respostas não adaptativas (VALENTE et al., 2008).

O impacto provocado pela não integração dessas memórias já havia sido descrito em 1887 pelo psicólogo e neurologista Pierre Janet, que em seus estudos apontava a influência de situações estressantes ou traumáticas sobre estados emocionais. Segundo ele, estados de excitação extremos poderiam provocar falhas na integração de memórias traumáticas, o que ocasionava uma contínua intromissão destas memórias

na forma de sensações de medo intenso, preocupações obsessivas e reexperimentações somáticas sob a forma de reações ansiosas (SCHESTATSKY et al., 2003). A pré-disposição genética, histórico de vida, natureza da ameaça vivenciada assim como a sua significância, emocional ou social, são alguns dos fatores que podem contribuir para a ocorrência de respostas mal adaptativas. Estas respostas podem resultar nos chamados Transtornos de Ansiedade, como o transtorno do pânico ou outros transtornos, como o transtorno obsessivo compulsivo e o transtorno de estresse pós-traumático.

1.2 TRANSTORNO DE ESTRESSE PÓS-TRAUMÁTICO - TEPT.

Em seus estudos sobre a histeria, Freud (1893) traz o conceito de trauma, em que aponta ser a causa da doença não danos físicos, mas sim o trauma psíquico, sendo este passível de se originar de qualquer experiência que possa evocar emoções aflitivas, tais como medo, angústia, vergonha e dor física. A noção de trauma é por ele trazida, portanto, como algo capaz de desencadear manifestações patológicas (FREUD, 1972).

Porém, foi após o fim da 2ª Guerra Mundial, com a observação que diversos soldados apresentavam alterações comportamentais após voltarem dos campos de batalha que constatou-se que tais eventos eram traumáticos e acarretavam prejuízos à saúde física e mental das pessoas afetadas. Em 1941, com a publicação do livro “As Neuroses Traumáticas de Guerra”, de Abram Kardiner, o Transtorno de Estresse Pós-Traumático começou a ser definido (SCHESTATSKY et al., 2003), e em 1980, este foi inserido na 3ª edição do Manual Diagnóstico e Estatístico dos Transtornos Mentais (DSM-III), publicado pela Associação Psiquiátrica Americana (APA) (SBARDELLOTO et al., 2011).

De acordo com o DSM, o TEPT “caracteriza-se pela revivência de um evento extremamente traumático, acompanhada por sintomas de excitação aumentada e esquiva de estímulos associados com o trauma” (DSM-V). Até o DSM-IV, o diagnóstico de TEPT exigia obrigatoriamente a ocorrência de vivência, testemunho ou confronto com um ou mais eventos que envolveram ameaça de vida ou a integridade física, própria ou de pessoas próximas, com intenso sentimento de medo, impotência ou terror. Na versão atualizada, DSM-V, o diagnóstico foi estendido às pessoas cujo familiar ou pessoas com grande proximidade foi exposto a um evento traumático ou por quem é frequentemente exposto a detalhes aversivos de eventos traumáticos, tais como paramédicos e outros profissionais da saúde. Esse critério não se aplica à

exposição através de mídia eletrônica, televisão, filmes ou imagens, a menos que esta exposição seja relacionada ao trabalho. O critério em que era exigido que o evento fosse vivenciado com intenso medo, impotência ou horror (Critério A2 do DSM-IV) foi retirado por não implicar em diferenças quanto ao diagnóstico e evolução do caso.

Atualmente, o TEPT tem sido descrito como o único distúrbio de saúde mental com uma causa conhecida (PITMAN et al., 2012), embora os fatores que levam à sua ocorrência ainda permaneçam desconhecidos, já que apenas uma parcela da população exposta a eventos traumáticos desenvolve este transtorno (GIUSTINO, MAREN, 2015).

A sintomatologia do TEPT é dividida em quatro eixos, sendo eles: reexperimentação do evento traumático (critério B), em que os indivíduos diagnosticados apresentam revivência dos eventos traumáticos, de forma constante e involuntária, podendo esta ocorrer através de memórias intrusivas ou *flashbacks*, pensamentos angustiantes e pesadelos. Evitação e embotamento (critério C), caracterizado por comportamentos de esquiva persistente em relação a fatores associados ao trauma, como pessoas, locais, conversas e situações, além de sentimentos de entorpecimento. Alterações negativas persistentes em cognições e humor (Critério D); Excitabilidade aumentada (Critério E) com intensa reatividade psicológica ou fisiológica, como se a pessoa revivesse o momento do trauma (RUIZ et al., 2007). O diagnóstico de TEPT exige que a duração destes sintomas deva ser superior a um mês e que a perturbação por eles gerada, ocasione sofrimento clinicamente significativo ou comprometimento do funcionamento no âmbito social, ocupacional ou em outras importantes áreas da vida (DASKALAKIS, LEHRNER, YEHUDA, 2013; ARNSTEN et al., 2015; DSM-IV, 2002; ARAÚJO, LOTUFO-NETO, 2014).

De acordo com dados da Pesquisa Nacional de Comorbidade (do inglês *National Comorbidity Survey, NCS*) do Estados Unidos da América (EUA), em torno de 8% da população mundial pode vir a desenvolver TEPT em algum momento de sua vida, sendo estimado que 11% das mulheres e 5% dos homens sejam afetados. Quando a sua incidência é analisada em populações de risco, os números sofrem considerável aumento, sendo estimada em 15,4% em populações afetadas por conflitos (HOSKINS et al., 2015) e para aproximadamente 30% em veteranos de guerra (KOENEN et al., 2008). Segundo o Departamento Americano de Assuntos de Veteranos de Guerra, nos EUA, entre 2002 e 2012, aproximadamente, 257.000 veteranos do Iraque e Afeganistão foram diagnosticados com TEPT. Somado a esse número, encontram-se aproximadamente, 1,63 milhões de veteranos de guerras, relacionados aos

atentados terroristas de 11 de setembro e aos conflitos resultantes que ocorreram posteriormente (BURBIEL, 2015).

O Brasil é o terceiro no ranking mundial de mortes por arma de fogo entre jovens de 15 a 24 anos e até o ano de 2005 ocupava a 6ª posição entre 91 países, ao se analisar as taxas de homicídios na população total (WAISELFISZ, 2010). O país apresenta também altos índices de acidentes automobilísticos, porém, apesar disso, o diagnóstico de TEPT recebe pouca atenção (FIGUEIRA, MENDLOWIC, 2003). Tendo o Brasil índices tão elevados de violência e acidentes automobilísticos e sendo o TEPT o principal transtorno neuropsiquiátrico relacionado a ocorrência de eventos traumáticos e de violência, verifica-se a necessidade de mais atenção na compreensão dos aspectos deste transtorno e também nas abordagens dispensadas no seu tratamento.

Estudos epidemiológicos mostram diferenças em relação ao gênero na ocorrência do TEPT. Embora homens apresentem maior risco de exposição a eventos potencialmente traumáticos (OLFF et al., 2007), a chance de se desenvolver TEPT após exposição a um trauma, é duas vezes mais elevada em mulheres (MORRIS, COMPAS, GARBER, 2012). Os pacientes com TEPT são seis vezes mais propensos a cometer suicídio, apresentam risco aumentado de abandonarem a escola ou faculdade e são mais propensos a apresentar instabilidade em relacionamentos interpessoais e conjugais (PACE, HEIM, 2011; ARNSTEN et al., 2015).

O TEPT causa significativo prejuízo não apenas na qualidade de vida das pessoas afetadas, mas também na esfera econômica, devido aos custos gerados por absenteísmo, afastamentos de trabalho, aposentadorias precoces e tratamentos (JONES et al., 2015). O comprometimento de trabalho sofrido por pacientes com TEPT é comparável ao de indivíduos com depressão maior, o que ressalta a gravidade da doença (DASKALAKIS, LEHRNER, YEHUDA, 2013). Estima-se que no ano 2000, a perda anual de produtividade por causa de TEPT nos EUA tenha sido de cerca de US\$3 bilhões (KESSLER, GREENBERG, 2002).

Embora seja classificado como um transtorno mental, o TEPT apresenta alta comorbidade com outras condições médicas, como hipertensão e doença cardiovascular, síndrome metabólica, síndrome da fadiga crônica, fibromialgia, doença gastrointestinal, dor crônica, doença respiratória, entre outras doenças (DASKALAKIS, LEHRNER, YEHUDA, 2013). A taxa de mortalidade entre as pessoas com TEPT é significativamente maior do que em pessoas saudáveis, o que pode ser explicado através de uma combinação de fatores, incluindo a visão distorcida e o preconceito ainda existente em relação à saúde mental e

seus tratamentos. Associado ainda a esse fato, há a limitada disponibilidade e alto custo dos tratamentos, o que faz com que muitos dos indivíduos não procurem tratamento mental especializado ou tenham dificuldade em seu acesso. Apesar disso, os pacientes com TEPT estão entre os que mais utilizam os serviços de cuidados primários, em função da grande variedade de queixas somáticas e médicas por eles apresentados (DASKALAKIS, LEHRNER, YEHUDA, 2013; BOSCARINO, 2004).

1.3 FISIOPATOLOGIA DO TEPT

O TEPT pode ser entendido como uma reação anormal a uma adversidade intensa, onde a reação de estresse e sensação de medo não cessa após o fim ou retirada do fator estressante. Desse modo, a busca de suas bases biológicas tem-se concentrado nos aspectos neuroendócrinos envolvidos nas reações de estresse e medo (GIUSTINO; MAREN, 2015). Regiões do cérebro como a amígdala, o hipocampo e o córtex pré-frontal medial (CPFm) são as regiões mais fortemente estudadas no TEPT, devido a relação que possuem com as respostas de medo e os mecanismos de aquisição e extinção do medo condicionado (MAREN, QUIRK, 2004; HERRY et al., 2010; DEJEAN et al., 2015).

A aquisição do medo condicionado é primariamente mediada pela amígdala basolateral - BLA, enquanto o CPFm modula sua consolidação e intensidade (MAREK et al., 2013; BREMNER, 2007). As sinalizações subsequentes ao término da ameaça são capazes de acarretar mudanças na resposta de medo, fazendo com que a sua consolidação seja alterada para um estado de extinção, sendo esse processo resultante também da interação entre BLA e CPFm. Uma das hipóteses sugeridas para a fisiopatologia do TEPT, descreve o transtorno como o fracasso ou impossibilidade da extinção do medo, que é referente ao aprendizado de que um estímulo específico não deve mais ser temido, por já não se encontrar mais em posição de oferecer perigo ou por este já ter sido cessado. Cabe ressaltar que não há eliminação das memórias referentes ao medo condicionado, o que ocorre é a aquisição de novas memórias, indicando que o que antes era ameaçador, já não é mais. No entanto, por razões ainda desconhecidas, este processo não ocorre no TEPT e o evento traumático continua a gerar respostas de medo, mesmo após a sua cessação, de modo que a consolidação do medo se mantém ao longo do tempo e de forma constante (KOEK et al., 2016).

Desse modo, os processos relacionados ao estresse podem levar a alterações estruturais e funcionais, geralmente atribuídas à "rede do medo", que inclui o hipocampo, amígdala e CPF. Estas alterações podem

explicar os sintomas típicos experimentados por pacientes com TEPT como respostas de medo intensificadas e não condizentes com o contexto, além de estados de medo e ansiedade constantes e injustificáveis. O CPF e o hipocampo agem como importantes moduladores da ativação do eixo HPA (MCLAUGHLIN et al., 2014), sendo a atuação do CPF pautada em efeitos inibidores sobre a liberação de CRH no hipotálamo e, por conseguinte, de cortisol das glândulas adrenais. A amígdala, no entanto, desempenha papel oposto, promovendo a ativação do eixo HPA (SHERIN, NEMEROFF, 2011), sendo sua atuação disfuncional relatada em modelos de neurocircuitaria do TEPT.

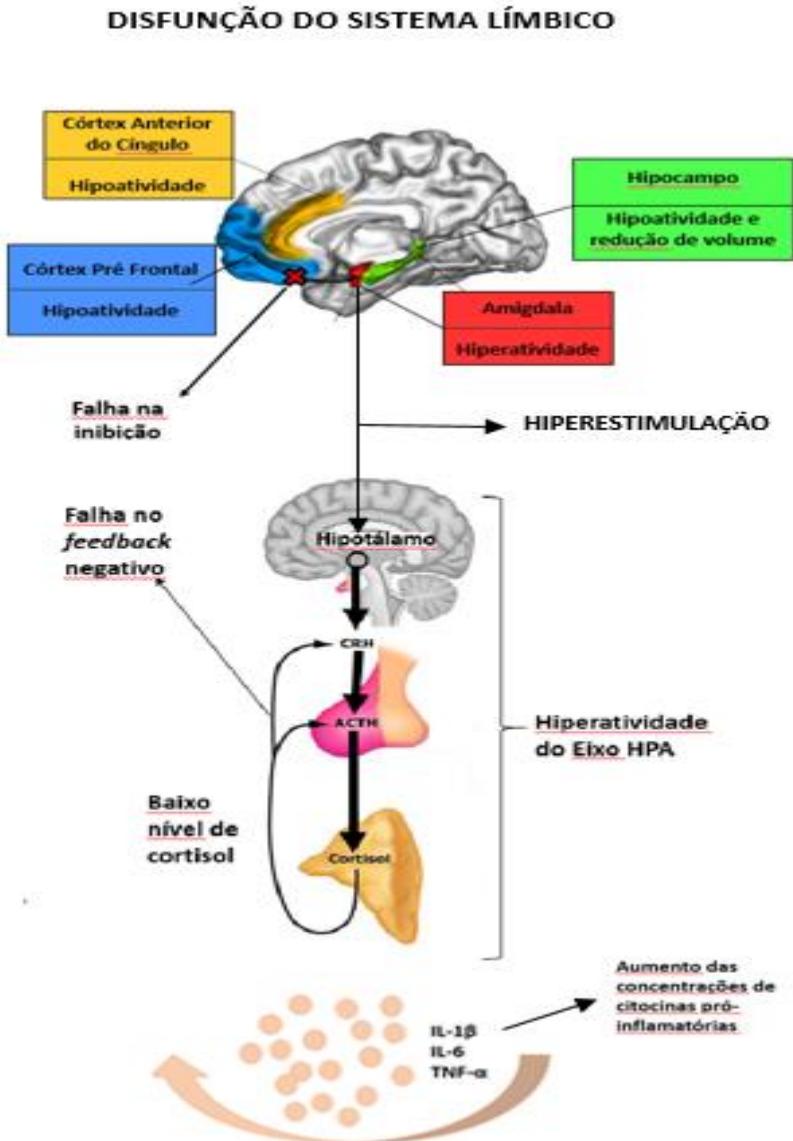
O modelo mais aceito de neurocircuitos de TEPT, ilustrado na Fig. 2, foi proposto pela primeira vez por Rauch e colaboradores (1998) e sugere a ocorrência de hipoativação do CPF (englobando o córtex cingulado anterior, córtex pré-frontal ventromedial, córtex subcaloso e córtex orbitofrontal) que resulta na incapacidade de controlar eficazmente a resposta a estímulos relacionados ao trauma. Sem a inibição por parte do CPF, o hipotálamo se mantém ativo, liberando CRH. Já a hiperatividade da amígdala resulta em uma emissão constante de alarme, resultando em constante ativação do eixo HPA, quando este já deveria apresentar diminuição de suas atividades. A hiperatividade da amígdala também estaria associada a ocorrência de lembranças vívidas e sintomas de hiperexcitação (RAUCH et al., 2006). Esse modelo também aborda o funcionamento anormal do hipocampo, que estaria envolvido em déficits de aprendizagem e de memória, resultando na incapacidade de extinção do medo (PATEL et al., 2012).

Estudo de neuroimagem realizados em pacientes com TEPT vêm fornecendo subsídios para esse modelo. Por exemplo, na comparação de estados sintomáticos e de repouso, hiperativação da amígdala correlaciona-se positivamente com sintomas de TEPT e gravidade do transtorno (KOEK et al., 2016).

Devido às alterações encontradas no funcionamento de regiões encefálicas envolvidas com respostas de medo e consequente influência destas no funcionamento hiperativo do eixo HPA, a expectativa é de que as concentrações de cortisol se apresentem elevadas, no entanto, alguns estudos encontraram concentrações reduzidas de cortisol em pacientes diagnosticados com TEPT (SHALEV et al., 2008). Uma possível explicação para este achado pode ser que, a exposição repetida a estímulos associados ou que promovam o estresse e, conseqüentemente, a constante liberação de cortisol, ocasione um aumento da regulação dos receptores de glicocorticoides, que por sua vez leva a redução dos níveis de cortisol. Essa redução, no entanto, implica em uma diminuição no grau

de inibição do feedback negativo sobre o hipotálamo e a pituitária. Como consequência, mais CRH é liberado no hipotálamo, seguido de liberação de ACTH na pituitária, porém, com baixos níveis de cortisol a reação de estresse não pode ser encerrada corretamente (KOEK et al., 2016). Esse processo é representado na Fig. 2.

Figura 2: Alterações funcionais de estruturas límbicas e do Eixo HPA no TEPT, com consequente aumento de citocinas pró-inflamatórias.



Ademais, os mecanismos fisiopatológicos do TEPT são complexos e como em diversos outros distúrbios psiquiátricos, são altas as probabilidades dos casos não compartilharem os mesmos mecanismos que levam à sua ocorrência, o que aumenta a dificuldade de compreensão deste transtorno e de desenvolvimento de novas abordagens de tratamento. Embora a investigação sobre a fisiopatologia do TEPT tenha sido historicamente pautada por estudos com enfoque neuroendócrinos, o sistema imunitário tem despertado atenção, devido a estreita relação existente entre ambos (KOEK et al., 2016).

1.4 NEUROINFLAMAÇÃO

1.4.1 Citocinas

A ideia da existência de uma interação entre a mente e o corpo é antiga e remete às concepções de Aristóteles, que acreditava serem estes, complementares entre si e capazes de provocarem alterações funcionais de forma bidirecional (PINHEIRO, 2008). Durante algum tempo, estudos avaliaram a capacidade de influência do SNC sobre o sistema imune (SI), sendo esta área de estudo denominada de “neuroimunomodulação” ou “psiconeuroimunologia”. No entanto, acreditava-se ser esta interação unidirecional (REICHLIN, 1993), o que foi refutado posteriormente, através 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, assim como em alterações comportamentais. Estudos vêm mostrando que o estresse, a ansiedade e a inflamação estão correlacionados, portanto, é pertinente supor que a resposta imunológica esteja envolvida na fisiopatologia do TEPT bem como em outras comorbidades (PACE, HEIM, 2011; 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). Esse 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).

Dos mediadores inflamatórios, os mais extensivamente estudados são as interleucinas 1beta (IL-1 β), interleucina 6 (IL-6) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) (JONES, THOMSEN, 2013).

Estas citocinas possuem significativo papel na indução do “comportamento de doença” e a administração delas por si só, na periferia ou no ventrículo lateral do cérebro, é capaz de induzir os componentes centrais da reação aguda da fase inflamatória, incluindo febre, ativação do eixo HPA e redução da atividade. A super expressão de IL-1 β , prejudica a função da memória, desempenho da memória espacial e de medo condicionado (CUNNINGHAM, SANDERSON, 2008; MOORE et al., 2009). Porém, concentrações reduzidas desta citocina se mostram necessárias para a plasticidade sináptica normal, uma vez que roedores sem o receptor para a IL-1 β , mostram disfunção de memórias (JONES et al., 2015; GOSHEN et al., 2007). Assim, observa-se, portanto, que a presença de IL-1 β não é prejudicial, mas sim o aumento da sua concentração fisiológica, que pode resultar no desenvolvimento fisiopatológico associado ao TEPT e outras doenças.

Ainda, a IL-1 β é uma das principais citocinas pró-inflamatórias envolvidas na regulação do eixo HPA. Essa citocina, além de ser expressa em todos os componentes do eixo HPA, afeta a secreção de CRH a partir do hipotálamo, ACTH da pituitária e de glicocorticoides a partir do córtex da adrenal (GADEK-MICHALSKA et al., 2013).

O TNF- α , por sua vez, tem um papel importante na resposta imunológica e pode eliminar tumores quando presentes em concentrações ideais. Porém, apesar dos efeitos benéficos, há uma gama de efeitos patológicos relacionados ao aumento da sua concentração no SNC e tais alterações podem contribuir para os mecanismos associados ao desenvolvimento da doença de alzheimer, doença de parkinson, esclerose múltipla e acidente vascular cerebral isquêmico (LORZ e MEHMET, 2009). Acredita-se também que haja envolvimento do TNF- α no TEPT, já que a frequência e gravidade de seus sintomas tem-se mostrado positivamente correlacionados com suas concentrações (von KANEL et al., 2007) e sua ação, em conjunto com a IL-1 β no hipotálamo, além de associada à indução de febre e supressão do apetite, é relacionada com a estimulação do eixo HPA.

Estudos clínicos e experimentais têm indicado que estresse e depressão estão associados com o aumento das concentrações circulante de TNF- α e IL-1 β (REMUS et al., 2013; GADEK-MICHALSKA et al., 2013), o que pode prejudicar processos cognitivos e de plasticidade sinápticas e contribuir para a progressão de transtornos neuropsiquiátricos, inclusive o TEPT (KHAIROVA et al., 2009).

Em um estudo em que foram analisadas as concentrações de citocinas no plasma de pacientes deprimidos com comportamentos suicidas, foi encontrado concentrações das citocinas pró-inflamatórias IL-6 e TNF- α significativamente maiores em pacientes deprimidos que tentaram suicídio em comparação com os pacientes deprimidos sem comportamento suicida (JANELIDZE et al., 2011; GHANSHYAM et al., 2012).

A semelhança, em animais de laboratório, entre os sintomas de comportamento doentio induzido por citocinas e depressão é grande. Em ambos os casos, ocorre isolamento social, mal-estar e anedonia. Somado a esses fatores, há o fato de que alguns componentes do comportamento de doença, como a diminuição da preferência de soluções doces e exploração social reduzida, são melhoradas por fármacos anti-depressivos. No entanto, a semelhança entre comportamento de doença e depressão é apenas parcial. O comportamento de doença é uma resposta adaptativa à infecção por agentes patogênicos e é reversível, uma vez que o agente é eliminado, o que não ocorre na depressão estabelecida por alterações nas concentrações de monoaminas (STEPANICHEV et al., 2014).

1.4.2 Fatores neurotróficos

Os fatores neurotróficos compõem duas famílias principais, sendo 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 (BARBOSA, 2009).

As alterações nas concentrações de neurotrofinas, como o BDNF (do inglês *brain-derived neurotrophic factor*) no hipocampo e regiões corticais pré-frontais, tem sido implicadas numa ampla variedade de doenças psiquiátricas tais como esquizofrenia, depressão maior, transtorno bipolar e TEPT (ZHANG, LI, HU, 2016; GREEN, CORSI-TRAVALI, NEUMEISTER, 2014). No TEPT, as mudanças ocorridas nesta via 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, CORSI-TRAVALI, NEUMEISTER, 2014).

As funções desempenhadas pelo BDNF são vastas e incluem o aumento da plasticidade, sobrevivência e crescimento celular, entre outras

funções. 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).

A redução do BDNF está associada também a estados de depressão. De fato, a redução na concentração plasmática de BDNF foi evidenciada em pacientes depressivos, sendo observado ao longo de tratamentos à base de antidepressivo, que estas concentrações foram aumentadas (MATSUOKA et al., 2015).

Por sua vez, o GDNF é encontrado principalmente nas regiões cerebrais, principalmente em regiões do estriado e áreas prosencefálicas, sendo considerado um dos mais potentes fatores neurotróficos de neurônios dopaminérgicos (AIRAKSINEN e SAARMA, 2002).

O GDNF, apresenta como característica a capacidade de exercer efeito neuroprotetor na população de neurônios periféricos e centrais (AIRAKSINEN e SAARMA, 2002), além de estar envolvido no desenvolvimento e manutenção de células gliais, serotoninérgicas e dopaminérgicas (DUCRAY et al, 2006) e a regulação de vias noradrenérgicas e GABAérgicas (SARABI et al., 2000).

O papel desempenhado pelo GDNF em doenças neurodegenerativas como Parkinson e Alzheimer tem sido alvo de estudos, porém, estudos envolvendo a participação do GDNF em distúrbios de humor são ainda relativamente muito recentes (BARBOSA, 2009). Níveis circulantes reduzidos de GDNF foram encontrados em pacientes com depressão (DINIZ et al., 2012; TSENG et al., 2013) e o estudo de Ubhi e colaboradores (2012) encontrou elevação dos níveis circulantes do GDNF e do RNA no hipocampo de roedores tratados com fluoxetina. No entanto, ainda não é possível afirmar se o GDNF desempenha algum papel no desenvolvimento, progressão ou tratamento de transtornos do humor (IBÁÑEZ, ANDRESSOO, 2016).

1.5 MODELOS ANIMAIS DE TRANSTORNO DE ESTRESSE PÓS-TRAUMÁTICO (TEPT)

Apesar de a etiologia do TEPT ainda não ser totalmente conhecida, há diversos modelos animais que buscam mimetizá-lo e que são usados em pesquisas pré-clínicas atualmente. No entanto, desenvolver um modelo animal para o TEPT não é algo simples, devido ao caráter fortemente subjetivo que compõe sua sintomatologia. O diagnóstico em humanos depende em sua maior parte de relatos verbais, referentes a expressão de pensamentos, sentimentos, sonhos e memórias (estas muitas vezes intrusivas) e que não podem ser estudados em animais. Desse modo, vários dos sintomas típicos do TEPT são encontrados, ou identificados, exclusivamente em seres humanos e, portanto, não são passíveis de reprodução no modelo animal (COHEN et al., 2012).

No entanto, apesar das limitações existentes, os modelos animais de TEPT são de grande valor para a compreensão de sua fisiopatologia e fornecem meios para que haja um aprofundamento cada vez maior sobre os aspectos neurobiológicos que o compõem, assim como permitem também o aprimoramento de tratamentos farmacológicos e novas abordagens terapêuticas (DASKALAKIS, YEHUDA, DIAMOND, 2013).

A composição da maior parte dos modelos animais existentes para o TEPT atualmente, baseia-se na exposição do animal a uma situação extrema de estresse, que desencadeia uma resposta de medo intenso. É esperado que após a aplicação do protocolo escolhido, o animal passe a apresentar características comportamentais semelhantes às encontradas no TEPT, como comportamento tipo depressivo e ansioso (BALI, JAGGI, 2015).

As situações de estresse mais comumente utilizadas na indução do comportamento semelhante ao TEPT são os protocolos de exposição ao odor de predador, exposição ao predador, estresse único e prolongado e choque inescapável nas patas (DASKALAKIS, YEHUDA, DIAMOND, 2013). Em função de apresentar grande validade de face e predição, o choque inescapável nas patas é considerado um dos melhores paradigmas para produzir trauma e para induzir o estado de TEPT em animais (BALI, JAGGI, 2015).

Com o objetivo de demonstrar a validade de face do modelo adotado, após um período de tempo determinado para cada protocolo, é feita uma avaliação comportamental onde o animal é reexposto ao ambiente estressante e são avaliados os comportamentos relacionados à

ansiedade e hiperexcitação que são tipicamente relacionados à memória do medo (DASKALAKIS, YEHUDA, DIAMOND, 2013).

A subsequente reexposição ao contexto condicionado, 24h após os estímulos aversivos, demonstram induzir intensa resposta de medo (altos níveis de *freezing*) em roedores, semelhante às respostas comportamentais encontradas em indivíduos com TEPT (LI et al., 2005).

A exposição a fatores de estresse é também uma abordagem para induzir comportamentos tipo depressivos em animais de laboratório. Eventos estressantes são considerados um dos principais fatores para o desenvolvimento de desordens de humor e apesar de vários sintomas importantes da depressão, como sentimento de vazio e pensamentos suicidas, não podem ser modelados em animais devido ao seu caráter subjetivo, esta abordagem tem alta validade de predição. Com efeito, a exposição ao estresse crônico ou mesmo a um único episódio de estresse pode causar alterações comportamentais específicas da depressão e que podem ser revertidos por fármacos antidepressivos (STEPANICHEV et al., 2014).

Em uma variação da reexposição ao contexto aversivo para verificação da eficácia do protocolo, o animal é reexposto ao ambiente, sem o estímulo aversivo repetidas vezes ou durante um único período de tempo. Esse processo, descrito inicialmente por Pavlov (1927), denominado extinção, é um comportamento aprendido, em que um contexto que anteriormente foi associado a algo aversivo é apresentado como não mais ameaçador (FITZGERALD, SEEMANN, MAREN, 2014). Desta maneira, o animal aprende que o estímulo ou o contexto já não sinalizam perigo e o comportamento normalmente passa a apresentar alterações, de modo a refletir uma diminuição gradual no medo. Em roedores de laboratório, a extinção muitas vezes se manifesta como uma diminuição mensurável no comportamento de *freezing* (FITZGERALD, SEEMANN, MAREN, 2014)

O *freezing* é um dos principais comportamentos de medo, apresentado por grande parte dos animais vertebrados, inclusive os utilizados em laboratório, em que o animal adota o comportamento de imobilidade total, fazendo movimentos apenas de respiração. Esse comportamento é caracterizado como uma imobilidade defensiva, na qual o organismo é passivo, mas preparado para responder ativamente a estímulos subsequentes (VALENTE et al., 2008).

Outro comportamento apresentado por roedores é o de autolimpeza ou autocuidado, denominado “*grooming*”, que é um comportamento típico e que pode ser afetado bidirecionalmente por manipulação experimental, incluindo lesões do trato nigroestriatal, administração de

fármacos dopaminérgicos, mutações genéticas e estresse psicológico. Além disso, o *grooming* é modulado por diversos circuitos, entre eles, o sistema límbico, incluindo a amígdala e o hipotálamo, sendo ambas as áreas envolvidas diretamente na fisiopatologia do TEPT (KALUEFF et al., 2016).

A compreensão mais acurada do comportamento de animais de laboratório visa permitir considerações mais precisas da representatividade dos comportamentos apresentados por eles e também da relação do comportamento apresentado e a patologia estudada. Desse modo, tem-se buscado estabelecer ligações entre sinalizações específicas, especialmente as comportamentais e estados emocionais de animais (BOISSY et al., 2007; DÉSIÉ et al., 2002). Com o objetivo de preencher esta lacuna, alguns estudos vêm procurando decodificar expressões faciais e suas alterações em diversas espécies animais utilizadas em laboratório, a fim de alcançarem uma maior compreensão do seu estado emocional (GRANDIN, DEESING, 2013).

A menção à presença de expressões faciais em animais, análogas a expressões faciais humanas, já havia sido demonstrada por Darwin (1872) em seus estudos (LECORPS, FERON, 2015). Na sua obra "*A expressão das emoções no homem e nos animais*" Darwin afirma que determinadas respostas emocionais, como as expressões faciais humanas, tendem a acompanhar os mesmos estados emocionais em todos os membros de uma espécie (PINEL, 2005). Porém, poucos trabalhos têm-se dedicado ao estudo e decodificação das expressões faciais em animais, principalmente em não primatas (DIOGO et al., 2009).

Uma característica comportamental que vem sendo observada e que se mostra como um promissor parâmetro de identificação de emocionalidade em camundongos é a posição da orelha (*ear position*), onde em testes como o labirinto em cruz elevado (do inglês *Elevate Plus Maze*) e reconhecimento de odor (do inglês *Novel Odour Test*), as alterações na posição da orelha foram relacionadas negativamente com maior índice de exploração dos animais (LECORPS, FERON, 2015).

No entanto, apesar de haver uma gama de comportamentos animais usados na transposição de diversas patologias em ensaios pré-clínicos, como os acima citados e diversos outros ainda existentes, ainda é necessária a ampliação do conhecimento acerca deles. Tais avanços possibilitariam a obtenção de resultados cada vez mais fidedignos e consequentemente, mais confiáveis acerca das patologias estudadas e que permitam superar as limitações de transposição atualmente existentes.

Outra limitação existente atualmente é a prevalência do uso de animais machos nos modelos experimentais. Existem evidências que

demonstram haver diferenças relacionadas ao gênero em condições patológicas, incluindo distúrbios de ansiedade e depressão, sendo o gênero feminino com mais do dobro da probabilidade de ser acometido. No entanto, apesar disso, a maioria dos estudos experimentais não levam em consideração esse fator e os estudos são realizados em sua maioria com roedores machos, o que dificulta uma translação mais fiel de dados experimentais para a clínica (STEPANICHEV et al., 2014).

1.6 TRATAMENTO

A busca por tratamentos eficazes para o TEPT apresenta um vasto histórico de respostas insatisfatórias envolvendo uma ampla gama de agentes farmacológicos, que incluem os inibidores seletivos da recaptação de serotonina (ISRS) e da noradrenalina (ISRN), inibidores da monoamina oxidase (IMAO), antidepressivos tricíclicos (TCAs), agentes adrenérgicos, benzodiazepínicos, estabilizadores de humor e antipsicóticos atípicos (DASKALAKIS, YEHUDA, DIAMONDS, 2013).

Em relação a tratamentos com abordagem psicológica, as formas de tratamento mais usuais, se dividem em duas categorias, tendo como foco experiências passadas ou concentrando-se no tempo presente e em seu enfrentamento. Exemplos de abordagens com foco em experiências passadas são a Exposição Prolongada, uma forma de terapia que se baseia no confronto direto e graduado aos objetos ou situações temidas (SOARES, LIMA, 2003). A terapia por exposição é aplicada segundo o fundamento de que a ansiedade é uma resposta condicionada que tende a diminuir através da habituação durante a exposição sistemática aos estímulos temidos (BUTLER et al., 1984). Terapia de Dessensibilização e Reprocessamento por meio dos Movimentos Oculares (do inglês *Eye Movement Desensitization and Reprocessing - EMDR*), que se baseia na reorganização e reprocessamento de memórias traumáticas, através da simulação do movimento dos olhos realizado durante o sono REM. Além da terapia de exposição narrativa, onde o paciente fala repetidamente sobre os acontecimentos traumáticos e dolorosos de seu passado, de modo a reexperimentar toda a emoção associada ao evento. Baseada em tempo presente, tem-se a Terapia Comportamental Cognitiva (TCC), que consiste no treinamento de habilidades de enfrentamento para melhorar o funcionamento em domínios tais como interpessoal, cognitivo e comportamental (KNAPP, BECK, 2008).

Os ISRS e a TCC são os dois tratamentos mais aceitos atualmente para TEPT (SOFUOGLU et al., 2014), sendo a sertralina e a paroxetina

as duas únicas medicações aprovados pela FDA (*Food and Drug Administration*), órgão americano responsável pela aprovação de drogas e alimentos, para o tratamento de TEPT (RYTWINSKIA et al., 2014). O Departamento de Defesa de Veteranos (DoD) do EUA também recomenda ISRS e ISRN como primeira linha farmacoterapêutica para o TEPT. Estas duas medicações têm-se mostrado capazes de reduzir alguns dos sintomas de TEPT dentro dos três principais grupos: revivescência, esquiva e hipervigilância (KOBAYASHI et al., 2015). No entanto, apesar disso, o índice de remissão dos sintomas dos pacientes tratados sequer chega a 50% e estima-se que apenas 65% dos pacientes diagnosticados com TEPT procuram por tratamento (WANG et al., 2005), apesar do prejuízo na qualidade de vida que o transtorno provoca.

Os tratamentos farmacológicos existentes atualmente, não são recomendados apenas para o TEPT, mas também para diversos outros transtornos, e nem sempre conseguem alcançar uma remissão completa ou encontram-se acessíveis a toda população. Aliado a esses fatores, há o fato de estes não serem livres de efeitos colaterais e, portanto, produzirem efeitos indesejados, o que pode se mostrar como um obstáculo à aderência ou continuidade à essa forma de tratamento (WESOLOWSKA, 2010).

Formas de tratamento preventivas para o TEPT também tem sido estudadas, como prevenções primárias, que são abordagens adotadas antes do evento traumático ocorrer. Para a população civil, abordagens preventivas não são relevantes, devido ao caráter imprevisível da ocorrência de eventos traumáticos e também por ainda não ser possível prever se um indivíduo desenvolverá o transtorno ou não. No entanto, em populações de alto risco de desenvolver TEPT, tais como bombeiros e militares em áreas de combate, formas preventivas de tratamento se mostram como uma nova e interessante abordagem a ser adotada (BURBIEL, 2015).

Ainda sobre formas preventivas de tratamento do TEPT, há a prevenção secundária, em que o tratamento é feito logo após a ocorrência do evento traumático, dentro do período chamado “janela terapêutica” e a prevenção terciária, em que o tratamento é iniciado tão logo os primeiros sintomas se tornem aparentes (BURBIEL, 2015).

2 PLANTAS MEDICINAIS

O uso de plantas e outros produtos oriundos da natureza com finalidades medicinais faz parte da história da humanidade, desde os tempos mais remotos e é considerada a prática mais antiga que se tem registro no tratamento de enfermidades (ANDRADE, CARDOSO, BASTOS, 2007). Dessa interação, entre o homem e a natureza e a sua busca por meios de prevenir e tratar enfermidades, originou-se as chamadas “medicina tradicional” e “medicina popular”. Sendo a medicina tradicional relacionada a grupos étnicos específicos e a medicina popular, pautada no resultado da interação de culturas diversas (RODRIGUES e OTSUKA, 2011).

Dotado de grande diversidade, tanto biológica quanto cultural, o Brasil possui grandes motivos para enaltecer a etnofarmacologia, a ciência que tem como objeto de estudo a utilização feita por diversos grupos populacionais, dos recursos naturais existentes em seus ambientes, para fins medicinais, ou seja, como medicamento para o tratamento das diversas enfermidades (RODRIGUES e OTSUKA, 2011). Cabe ressaltar que muitas vezes o conhecimento acerca das propriedades e usos de plantas medicinais pode ser o único recurso que muitas comunidades e grupos étnicos possuem, no que se refere a prevenção e tratamentos de saúde (HOEFFEL et al., 2011). Essa limitação pode ser em função da grande extensão territorial do país, que torna dificultoso ou restrito o acesso a sistemas de saúde, sejam eles públicos ou privados, pela população ou determinados grupos (RODRIGUES e OTSUKA, 2011).

Giraldi e Hanazaki (2010), realizaram na cidade de Florianópolis, um trabalho de identificação de usos de plantas medicinais por parte da população nativa da região do Sertão do Ribeirão, localizada na região do sul da ilha. Neste trabalho, observou-se a existência de conhecimentos tradicionais sobre plantas medicinais na região e que remetiam à história local, denotando a miscigenação cultural existente entre ameríndios, europeus e africanos, observada desde os tempos da colonização. Também foi observado serem estes conhecimentos, em sua maioria, adquiridos através de familiares, como pais e avós ou então, através de pessoas que vivem na mesma região, demonstrando haver expressiva herança cultural acerca de conhecimentos envolvendo plantas medicinais nessa localidade.

O grande uso de ervas na medicina popular pode ser explicada talvez, pela facilidade com que são encontradas, podendo ser cultivadas em quintais, o que facilita a obtenção desses recursos vegetais (PILLA et al., 2006). Outro fator contribuinte é a associação entre a cultura étnica, o

conhecimento e uso acerca das plantas, sendo muitas vezes esses usos passados de pais para filhos ou característicos de uma determinada localidade ou grupo étnico (GIRALDI e HANAZAKI, 2010).

Em dezembro de 2008 foi instituído o Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. Esse programa tem como objetivo inserir, de forma segura e eficaz plantas medicinais, fitoterápicos e serviços relacionados à fitoterapia no Sistema Único de Saúde (SUS). Ainda em seu escopo, está a promoção e reconhecimento de práticas populares e tradicionais de uso de plantas medicinais. Desse modo, estudos etnobotânicos podem contribuir, através da listagem de plantas medicinais já conhecidas e utilizadas em determinada região, com potencial para serem inseridas em sistemas públicos de saúde (GIRALDI, HANAZAKI, 2010).

Entre as diversas plantas utilizadas na medicina popular e que têm sido objeto de estudo de diversos trabalhos, encontram-se as pertencentes ao gênero *Polygala*. As plantas deste gênero são amplamente distribuídas pelo planeta, não sendo encontradas apenas na Nova Zelândia e nas Zonas Ártica e Antártica (LÜDTKE, SOUZA-CHIES, MIOTTO, 2013). As espécies deste gênero são ervas, subarbustos, podendo algumas poucas vezes serem encontradas na forma de árvores com flores brancas, esverdeadas, rosas ou roxas. Estima-se a existência de mais de 700 espécies deste gênero sendo utilizadas pela população como expectorante, sedativa, na neutralização de venenos de cobras, antifúngicas e analgésicas entre vários outros usos. Essa diversidade faz com que o gênero *Polygala* seja objeto de interesse na pesquisa farmacológica devido ao seu grande potencial fitoterápico (LÜDTKE, SOUZA-CHIES, MIOTTO, 2013).

Diversas espécies de *Polygala* tem sido alvo de estudos, devido às propriedades benéficas a elas associadas. Como exemplo, pode-se citar a *Polygala tenuifolia* W., utilizada no tratamento de doenças psicóticas na medicina coreana e chinesa (CHUNG et al, 2002), além de apresentar propriedades anti-inflamatórias e neuroprotetoras; a *Polygala fallax* H, também com propriedades antiinflamatória (KOU et al., 2003); *Polygala cyparissias* St. Hillaire & Moquin, com atividade antinociceptiva (CAMPOS et al., 1997) e efeito antiespasmódico (EL SAYAH et al., 1999) e a *Polygala paniculata*, objeto de estudo do presente trabalho.

2.1 *Polygala paniculata*

Amplamente encontrada em várias regiões do Brasil e inclusive no estado de Santa Catarina, a *Polygala paniculata*, ilustrada na Fig. 3, é conhecida popularmente como barba-de-são-pedro, vassourinha-branca, mimosinha, bromil, gelol entre outros (NEWALL et al., 1996; LORENZI e MATOS 2002; LAPA et al., 2007). Segundo Paiva (1998), a *Polygala paniculata* é a espécie mais amplamente distribuída do gênero, sendo encontrada em lugares diversos e com características também diversas como beiras de estradas, em solos úmidos, secos, arenosos, restingas, beiras de matas de planície, no interior e na orla de capoeiras, campos arbustivos e, mais raramente, em banhados. É considerada, frequentemente, uma planta ruderal, embora tenha sido coletada também em locais preservados. Floresce e frutifica em todos os meses do ano (LÜDTKE, SOUZA-CHIES, MIOTTO, 2013).

Figura 3: Exemplos de *Polygala paniculata*. Painéis A e B, parte aérea da planta. Painel C, exemplar de sua flor em destaque.



Fonte: Painel A, L.L. Co; Painel B, M. Fagg e painel C, G.D. Carr.

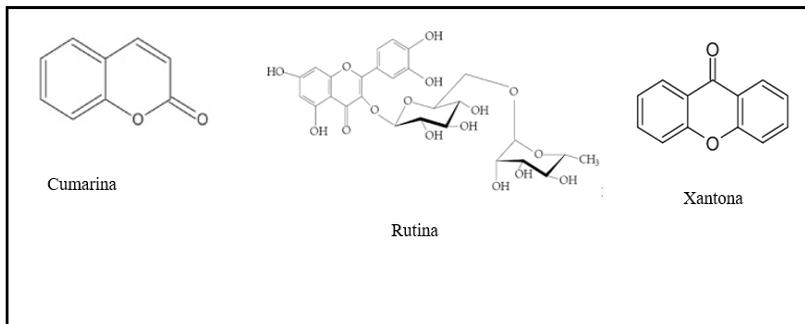
É usada na forma de chá na medicina popular e seu uso se estende para tratamentos diversos, tais como de asma, bronquite crônica, artrite, artrose, problemas renais, dor de estômago, diarreia, bem como tonificante (NEWALL et al., 1996; LORENZI e MATOS, 2002; LAPA, 2006). Em Florianópolis, na região do sul da ilha, foi identificado uso da *Polygala paniculata* no tratamento de dores musculares, sendo o armazenamento da planta para o uso, nestes casos, em forma de tintura. (GIRALDI e HANAZAKI, 2010).

Outros usos associados à *Polygala paniculata* são relacionados com a sua característica de odor de “gelol”, liberado pela sua raiz quando retirada do solo (AGUIAR et al., 2008). Ao se fazer uma busca na internet utilizando-se os termos “*Polygala paniculata* gelol” é possível encontrar várias menções ao uso da planta, em sites voltados para divulgação de plantas com propriedades medicinais ou que buscam enfatizar os benefícios encontrados em plantas e produtos de origem natural. Ressalta-se, porém, que estes sites não estão associados com estudos de base científica, sendo em sua maioria, baseados apenas em conhecimentos e usos populares.

As menções encontradas em meios eletrônicos sobre o uso da *Polygala paniculata* são diversas, sendo encontradas citações sobre o uso de suas raízes, como descongestionante nasal e também para contusões e reumatismo, sendo estes usos em Santa Catarina, remetidos aos açorianos. Outros benefícios associados a *Polygala paniculata*, encontrados em pesquisas na internet são: amaciante da pele, anti-inflamatório, diurético, expectorante, laxante, vomitiva. Porém, ressalta-se que estes usos não se encontram referenciados de nenhum modo, não sendo possível, portanto, afirmar seus efeitos, o uso efetivo nos tratamentos de tais condições e à qual região estes usos ou conhecimentos se remetem.

Embora vários dos efeitos terapêuticos associados à *Polygala paniculata* na medicina popular ainda careçam de comprovação científica, estudos fitoquímicos realizados permitiram a identificação de alguns de seus compostos e confirmaram a presença de vários metabolitos secundários na *Polygala paniculata*. Entre os já identificados, pode-se citar a cumarina (HAMBURGER, GUPTA, HOSTETTMANN, 1985), o flavonóide rutina (LAPA, 2006) e xantonas (CRISTIANO et al., 2003), representados na Fig. 4.

Figura 4: Estrutura química dos compostos cumarina, rutina e xantona respectivamente, encontrados no EHPp.



As cumarinas, presentes em diversos produtos naturais, tem grande importância devido a suas diversas atividades biológicas e a larga utilização na química. Ocorrem como metabolitos secundários em diversas partes de plantas, tais como raízes, folhas, frutos, flores e sementes, especialmente de plantas verdes (HOULT, PAYÁ, 1996). Entre os efeitos associados a cumarinas pode-se citar atividade vasorelaxante (CHEN et al., 2000), anti-inflamatória (CHENG et al., 2004; CURINI et al., 2004), imunossupressora (TADA et al., 2002) e antidepressiva (SINGH et al., 1992).

A rutina é um flavonoide pertencente à subclasse dos flavonóis, que tem se destacado em função das suas diversas atividades farmacológicas (PEDRIALI, 2005). Alimentos como cebola, uva, trigo serraceno, feijão vermelho, maçãs, tomates e bebidas como vinho tinto e chá preto são fontes desse flavonoide (THOMSON et al., 1999). Possuem ação terapêutica em patologias que envolvam radicais livres e não são tóxicos, especialmente a rutina. Várias outras atividades da rutina vêm sendo estudadas, como seu efeito anticonvulsivante em ratos (NASSIRI-ALS, SHARIATI-RAD, ZAMANSOLTANI, 2008), supressão da imunidade celular (MIDDLETON et al., 2000) e efeito antiinflamatório (GUARDIA et al., 2001).

Por sua vez, as xantonas têm sido isoladas a partir de uma variedade de fontes naturais, tais como plantas superiores, fungos e líquenes. Possuem interessantes propriedades farmacológicas. Uma ação de grande interesse apresentada pelas xantonas é sua ação inibitória da enzima monoaminooxidase (MAO), relacionada com o tratamento de estados depressivos. Por demonstrarem atividade inibitória potente,

seletiva e reversível desta enzima, as xantonas apresentam um grande potencial de utilização (GNERRE et al., 2001; SANTOS et al., 2003).

Estudos realizados com o extrato hidroalcolólico de *Polygala paniculata* (EHPp), identificaram entre seus efeitos, expressiva ação antioxidante, devido ao efeito protetor apresentado contra a neurotoxicidade induzida pelo tratamento crônico de camundongos com metilmercúrio (MeHg) (FARINA et al., 2005). Ademais, os autores relataram que o efeito neuroprotetor encontrado poderia estar associado com a presença no extrato de xantonas e flavonoides, que possuem importante ação antioxidante.

Lapa e colaboradores (2007), mostraram que o EHPp apresenta importante atividade gastroprotetora, ou seja, ele foi capaz de reduzir as lesões estomacais (ulceras gástricas) induzidas por etanol em ratos, sendo este efeito também associado a ação antioxidante do extrato. Por sua vez, Lapa e colaboradores (2011) demonstraram que o EHPp possui importante efeito hipotensor e vaso-relaxante, através de estudos *in vivo* e *in vitro*, sendo que estas ações foram associadas à presença do flavonoide rutina.

No presente estudo, cabe destacar os trabalhos conduzidos por Lapa e colaboradores (2009) e Bettio e colaboradores (2011) com a *Polygala paniculata*.

Lapa e colaboradores (2009) mostraram que o EHPp promoveu significativa redução da nocicepção (dor) causada por agentes químicos (por exemplo, ácido acético, capsaicina, cinamaldeído, glutamato e formalina) em camundongos. Além disto, os autores também evidenciaram que o EHPp foi capaz de reduzir a nocicepção causada pela administração intratecal de citocinas, tais como interleucina-1 β (IL-1 β) e fator de necrose tumoral (TNF- α), e pelo agonista glutamatérgico ionotrópico NMDA (N-metil-D-aspartato). Assim, esses resultados denotam uma possível ação anti-inflamatória da planta e entre as possibilidades consideradas para tal efeito, está a da inibição da ação das citocinas IL-1 β e TNF- α , bem como o bloqueio do receptor ionotrópico para glutamato, NMDA, que estudos tem mostrado estarem envolvidas no desenvolvimento de desordens psiquiátricas (GADEK-MICHALSKA et al., 2013).

Por outro lado, Bettio e colaboradores (2011), demonstraram que o EHPp também é dotado de importante atividade antidepressiva. O EHPp foi capaz de reduzir o tempo de imobilidade observado no teste do nado forçado, um dos testes preditivos mais utilizados para avaliação de efeitos anti-depressivos de drogas. Os autores também observaram que o efeito anti-depressivo observado foi dependente da interação com os

receptores serotoninérgicos (5-HT_{2A}), noradrenérgicos (α_2 e β) e dopaminérgicos (D1 e D2). Considerando-se que o sistema monoaminérgico está implicado na fisiopatologia e tratamento da depressão e que esta, é uma das principais comorbidades que afetam os indivíduos diagnosticados com TEPT, seus efeitos se tornam atrativos e fortalecem a hipótese que a *Polygala paniculata* pode possuir potencialidade terapêutica para esta patologia.

Desse modo, com base nos aspectos expostos referentes às características do TEPT e dos efeitos já comprovados da *P. paniculata*, é possível especular sobre um potencial terapêutico a nível pré-clínico, em um modelo animal desse transtorno.

3 JUSTIFICATIVA

O TEPT é um transtorno frequentemente incapacitante, que afeta uma considerável parcela da população. No entanto, os tratamentos atualmente disponíveis são limitados, com taxas modestas de remissão dos sintomas. Desse modo, a busca por novas formas de tratamento torna-se não apenas relevante, mas também necessária.

O uso de plantas medicinais no tratamento de diversas enfermidades é feito já há muito tempo pelo homem, sendo este uso mantido até os dias atuais, principalmente por populações de baixa renda, com acesso restrito a atendimento médico ou resistentes às formas de tratamento farmacológicas atualmente existentes. O Brasil possui um dos ecossistemas mais ricos do mundo e apesar da rica biodiversidade que apresenta, da grande aceitação e do já extenso uso terapêutico feito pela população em geral, as plantas medicinais ainda têm sido pouco estudadas cientificamente. Estes estudos são necessários para que seus efeitos sejam melhor elucidados e sejam também comprovados cientificamente, e também, para que sejam asseguradas qualidade, segurança e eficácia em seus usos.

Desse modo, a justificativa desse estudo é pautada na necessidade da busca por novas formas de tratamento para o TEPT e na investigação de potenciais efeitos do extrato de *Polygala paniculata* nesta patologia, que baseado em efeitos mostrados anteriormente em outros estudos, mostram-se como promissores.

4 OBJETIVOS

4.1 GERAL:

Verificar o efeito do extrato hidroalcoólico de *Polygala paniculata* em um modelo animal de transtorno de estresse pós-traumático.

4.2 ESPECÍFICOS:

Verificar se o EHPP apresenta efeito ansiolítico no modelo de Transtorno de estresse pós-traumático em camundongos fêmeas.

Verificar se o EHPP apresenta efeito tipo antidepressivo no modelo de Transtorno de estresse pós-traumático em camundongos fêmeas.

Verificar possível ação do EHPP na modulação de memórias aversivas.

Avaliar o efeito do EHPP sob a expressão genica de BDNF, GDNF, IL-1 β e TNF- α , no hipotálamo, córtex pré-frontal e hipocampo de camundongos fêmeas submetidas ao modelo de indução de TEPT.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 ANIMAIS

Foram utilizados 235 camundongos *Swiss* fêmeas, com aproximadamente dois meses de idade, peso entre 25 a 35 g, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) localizado no Campus Reitor João David Ferreira Lima, Florianópolis, SC. Após serem recebidos, os animais foram mantidos no biotério do Laboratório de Neurobiologia da Dor e da Inflamação (LANDI), Departamento de Ciências Fisiológicas/CCB, em micro-isoladores (ALESCO) contendo no máximo 6 animais por caixa, com ventilação, sob condições controladas de temperatura ($20 \pm 2^\circ\text{C}$) e umidade (60% - 80%) em ciclos de 12 horas claro-escuro (6 às 18 horas), além de livre acesso a água e ração.

Para a realização dos estudos comportamentais, os camundongos foram distribuídos homogeneamente entre os grupos e mantidos no laboratório para ambientação por pelo menos 1 hora antes da realização dos experimentos. Todos os procedimentos utilizados neste estudo foram aprovados pela Comissão de Ética para o Uso de Animais (CEUA/UFSC) sob protocolo nº PP00745 e conduzidos de acordo com as normas de cuidados com animais de laboratório e diretrizes éticas para investigação de dor em animais conscientes.

Ressalta-se que todos os procedimentos foram executados de maneira a preservar ao máximo a integridade física dos animais, tendo como princípio reduzir ao máximo o sofrimento eventualmente causado, porém, necessário para a demonstração da efetividade do modelo proposto.

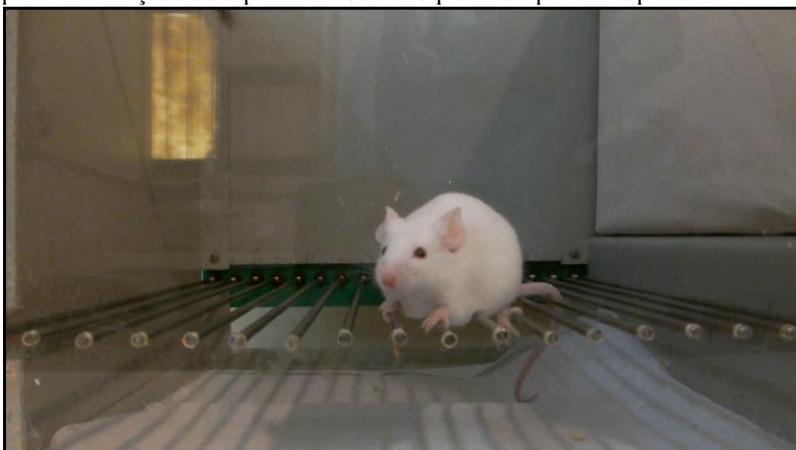
5.2 INDUÇÃO DO MODELO DE TRANSTORNO DE ESTRESSE PÓS-TRAUMÁTICO

O modelo adotado, de choque inescapável nas patas, foi descrito por Pynoos e colaboradores (1996). Para a realização do protocolo de indução de TEPT, foi utilizado o equipamento *Step-Down* (Modelo EFF 342, INSIGHT, São Paulo, SP), empregado normalmente para o teste de Esquiva Inibitória. Para atender as necessidades do modelo de TEPT, o aparato teve a área da plataforma devidamente isolada para a realização destes experimentos, como é mostrado na Fig. 5.

Os animais foram colocados no aparato e após breve período de adaptação (30 segundos), foram aplicados choques em suas patas através

das barras de metal localizado no assoalho do aparato, sem que houvesse a possibilidade de escape do animal. Os choques possuíam intensidade de 0,8 mA e cinco segundos de duração, sendo aplicados a cada vez dois choques consecutivos, resultando em dez segundos de choque. Entre cada sequência de choque, foi dado um intervalo de 30 segundos, sendo este procedimento repetido por mais quatro vezes, totalizando 10 choques divididos em 5 sequências, como é mostrado na Fig. 5. Após o término, os animais foram colocados novamente em caixas de acondicionamento e após 30 minutos, cada grupo recebeu o tratamento específico (item 5.3).

Figura 5. Representação do animal no aparato de Esquiva Inibitória, adaptado para a realização dos experimentos de choque inescapável nas patas.



Fonte: Imagem elaborada pela autora).

5.3 DROGAS E TRATAMENTO

A obtenção e preparação do extrato hidroalcoólico de *Polygala paniculata* foi realizada pelo grupo de pesquisa coordenado pelo Prof^o Moacir G. Pizzolatti do Departamento de Química da UFSC. Para tal, cerca de 1000 g da planta inteira, seca e triturada foram submetidos à extração, por maceração em 80% de etanol-água, à temperatura ambiente ($22 \pm 3^\circ \text{C}$), por 14 dias. O etanol foi evaporado e o extrato (rendimento 50 g) foi concentrado ao nível desejado.

Para preparação da solução a ser usada no tratamento dos animais, realizou-se a diluição do extrato em salina com 5% de *Tween* 80. Como controle positivo foi utilizado sertralina, dissolvida em salina com 10% de DMSO (Dimetilsulfóxido). Todas as soluções foram preparadas

previamente à realização de cada experimento, não sendo armazenadas para uso posterior.

Trinta minutos após a execução do protocolo de choques, os animais foram tratados por via intra gástrica (através de gavagem), com salina (10 ml/kg), extrato hidroalcoólico de *Polygala paniculata* (EHPp) nas doses de 0,001; 0,01; 0,1 e 1,0 mg/kg ou sertralina, na dose de 15 mg/kg (Fig. 6 e tabela 1). As doses utilizadas foram baseadas em estudos anteriores em que também foi utilizado o EHPp e dados do laboratório.

Após a realização do experimento com as diferentes doses do EHPp, foi estabelecida a dose mais efetiva, 0,1 mg/kg, sendo esta a escolhida para os estudos posteriores (Fig. 6 e tabela 1). A dose de sertralina utilizada foi escolhida baseada no estudo de Zhang et al. (2015). O tempo do tratamento foi baseado em trabalhos anteriores do próprio laboratório e também no estudo de Levkovitz et al. (2014).

Figura 6: Sequência dos procedimentos realizados, desde a indução do TEPT até o tratamento dos animais.

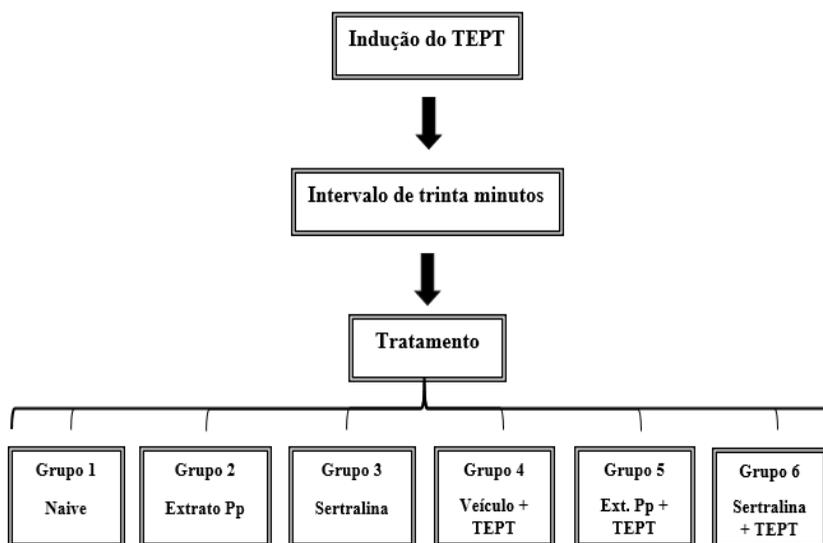


Tabela 1: Especificação dos grupos de animais usados na parte experimental do presente estudo e seus respectivos tratamentos

GRUPO	TRATAMENTO
Grupo 1: Naïve	Animais que não receberam nenhum tipo de intervenção
Grupo 2:EHPp	Animais que receberam apenas tratamento com EHPp e não receberam choques.
Grupo 3: Sertralina	Animais que receberam apenas o tratamento com sertralina e não receberam choques.
Grupo 4:Veículo +TEPT	Animais que receberam choques e foram tratados com salina.
Grupo 5:EHPp + TEPT	Animais que receberam choques e foram tratados com EHPp.
Grupo 6:Sertralina +TEPT	Animais que receberam choques e foram tratados com sertralina.

Fonte: Elaborada pela autora.

5.4 AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL

Entre os sintomas mais prevalentes no TEPT, estão as memórias intrusivas/resposta exacerbada de medo e a depressão. Desse modo, foram realizados testes comportamentais para avaliação da presença de tais estados nos animais e verificação de possíveis efeitos do extrato sobre eles. Com exceção do teste de Esquiva Inibitória, todos os experimentos foram filmados, para análise posterior. Nas filmagens realizadas, foi utilizada uma *web cam* modelo *Logitech HD 270*, conectada a um notebook. Durante a realização dos experimentos, o experimentador não permanecia na sala experimental, de modo a não interferir na resposta comportamental dos animais.

Para isso, inicialmente, os animais passaram por uma etapa de reexposição ao aparato de choque, vinte e quatro horas após a indução do modelo de TEPT. Na reexposição os animais permaneceram no aparato por três minutos (cento e oitenta segundos) e os comportamentos de latência, *freezing*, *grooming*, *rearing* e *ear position*, foram avaliados. Vale ressaltar que com exceção dos comportamentos de *ear position* e *rearing*, todos os demais foram mensurados através de cronômetros, para a contagem do tempo total de sua ocorrência. Salienta-se que o aparato foi limpo com álcool a 20% entre um animal e outro, de modo a se eliminar

possíveis odores que poderiam afetar a resposta comportamental dos animais.

5.4.1 Medo e Ansiedade

5.4.1.1 *Freezing*

O "*freezing*" ou "congelamento" é caracterizado como um comportamento de imobilidade total, excetuando os movimentos de respiração. Considera-se este estado como uma imobilidade defensiva, na qual o organismo é passivo, mas preparado para responder ativamente a estímulos subsequentes (VALENTE et al., 2008). 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).

Durante o período de três minutos, os animais foram reexpostos ao aparato, sendo cronometrado o tempo de *freezing*. Foi considerado todo o tempo em que o animal apresentou imobilidade total, com movimentos únicos apenas de respiração. Quando o animal realizava qualquer tipo de movimentação, a contagem era interrompida e retomada quando este voltava a apresentar imobilidade.

5.4.1.2 Latência de movimento

A reação de *freezing* é associada tanto ao medo, que é a reação a uma ameaça real e identificada ou a ansiedade, relacionada a sensação ou sugestão de ameaça. De modo geral, animais que recebem choque nas patas, tendem a permanecer imóveis ou se movimentarem ou locomoverem pouco, no período em que são reexpostos no aparato. Em outros testes comportamentais, como Labirinto em Cruz Elevado, Caixa Claro/Escuro e Teste do Nado Forçado, a latência dos animais em apresentar o comportamento analisado é também avaliada. Desse modo, no presente trabalho, optou-se por avaliar também, a latência dos animais para sair pela primeira vez do estado de *freezing* e se movimentar pelo aparato. A latência de movimento foi considerada a partir do momento em que o animal foi colocado dentro do aparato até o momento em que este saía pela primeira vez do estado de *freezing*.

5.4.1.3 *Grooming*

Comportamento de autolimpeza ou autocuidado observado em roedores, conforme ilustrado na Fig. 7. Devido às correlações existentes entre comportamentos tipo ansioso e o *grooming* em camundongos (KALUEFF et al., 2016), a mensuração deste comportamento foi realizada, com o objetivo de se observar a influência que o estresse exerce em sua execução. A mensuração do *grooming* foi feita através da cronometragem do tempo total de sua ocorrência.

Figura 7: Comportamento de *grooming* em animal reexposto ao aparato de choque



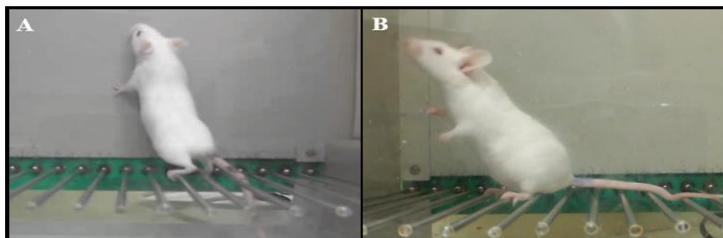
Fonte: Imagem elaborada pela autora (2016).

5.4.1.4 *Rearing*

O *rearing* é referente a atividade exploratória e/ou locomoção em um novo ambiente, podendo existir, contudo, a influência da ansiedade neste fator (BOERNGEN-LACERDA, SOUZA-FORMIGONI, 2000).

O *rearing* é um comportamento em que o animal se apoia somente nas patas traseiras, mantém o corpo ereto e ergue a cabeça em direção ao alto (Fig. 8B), podendo este comportamento ser realizado também utilizando as paredes do aparato como apoio, sendo neste caso denominado *climbing*, Fig. 8A. Durante o período de reexposição do animal ao aparato, foi registrado o número de vezes que o animal apresentou este comportamento.

Figura 8: Imagem A, animal realizando comportamento de *climbing*. Na imagem B, animal apresentando comportamento de *rearing*.

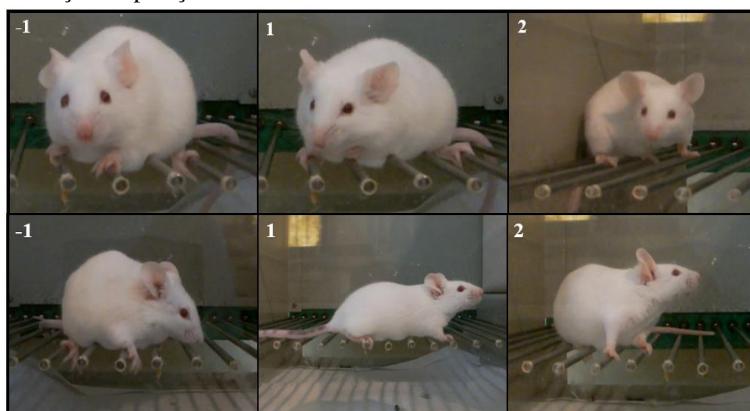


Fonte: (Imagens elaboradas pela autora).

5.4.1.5 *Ear position*

A avaliação da posição da orelha dos camundongos, após passarem pelo protocolo de indução de TEPT, foi registrada e analisada utilizando-se um escore baseado no trabalho de Lecorps e Féron (2015). O escore constitui-se de valores que partem de -1 a 2, sendo -1 a posição mais retraída e junta ao corpo e 2, a posição elevada e posicionada para a frente (Fig. 9). A avaliação foi feita nos primeiros 60 segundos de reexposição dos animais ao aparato de choque e foi considerado o comportamento prevalente, ou seja, a postura da orelha apresentada por mais tempo pelos animais.

Figura 9: Escore adaptado do trabalho de Lecorps e Féron (2015), utilizado para mensuração da posição da orelha.



Fonte: Imagens elaboradas pela autora.

5.4.2 Avaliação Comportamental tipo Depressão

5.4.2.1 Teste do Nado Forçado

O teste do nado forçado é largamente utilizado em estudos pré-clínicos, para avaliação do potencial antidepressivo de novos fármacos. Elaborado inicialmente por Porsolt et al. em 1978, o teste baseia-se na aversão inata de camundongos à água (ALMEIDA et al., 2011). Neste teste é contabilizado o tempo de imobilidade total do animal, sendo este um indicativo de comportamento tipo-depressivo. Os fármacos com potencial antidepressivo teriam a capacidade de diminuir o tempo de imobilidade apresentado pelos animais e aumentar o tempo de latência para a imobilidade (ALMEIDA et al., 2011).

Para a realização deste teste, os animais foram colocados em cilindros plásticos, com 45 cm de profundidade e 6 cm de diâmetro, preenchidos até a altura de 30 cm com água na temperatura de 25 °C. A água de cada cilindro foi trocada ao fim do teste de cada animal, para se evitar influência de odores deixados por outros animais.

Os animais foram avaliados durante o período de seis minutos (360 segundos), sendo o teste filmado e sua avaliação feita posteriormente.

5.4.3 Avaliação da memória aversiva

5.4.3.1 Esquiva inibitória

Teste amplamente utilizado em avaliações que envolvam memória aversiva e de medo ou para a avaliação de drogas com efeitos amnésicos ou que ajam sobre a memória (SOARES et al., 2011).

Este teste constitui-se de duas fases, sendo a primeira o treino, e a segunda, 24 horas depois, o teste. Em ambas as fases, é medida a latência dos animais para descerem da plataforma, como mostrado na Fig. 10.

Na fase de treino, os animais foram colocados na plataforma do aparato e após descerem e encostarem as quatro patas no assoalho (grades de metal), receberam um choque com intensidade de 0.6 mA, com duração de cinco segundos, sendo retirados do aparato logo após. Decorridos 30 minutos, os animais receberam os respectivos tratamentos, salina (10 ml/kg), EHPp (0,1 mg/kg) e sertralina (15 mg/kg). Vinte e quatro horas depois, os animais foram recolocados na plataforma e a latência para a descida da plataforma, mensurada novamente.

O teste se encerra após o animal descer da plataforma, ou após atingir o teto de 180 segundos sem descer da plataforma, o que ocorrer

primeiro (SOARES et al., 2011).

Os animais utilizados neste teste não passaram pela indução do modelo de TEPT e nem por nenhum outro teste comportamental.

Figura 10: Animal na plataforma do aparato de Esquiva Inibitória.



Fonte: Imagem elaborada pela autora.

5.5 AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA “EX VIVO”

No primeiro dia após a indução do modelo de TEPT, decorridos 30 min após serem reexpostos ao aparato de choque, os camundongos foram anestesiados com isoflurano (2-3% a 100% de oxigênio) e eutanasiados por decapitação para retirada do hipocampo, hipotálamo e córtex pré-frontal. A retirada das estruturas foi realizada em ambiente previamente limpo e esterilizado. Além disto, o material cirúrgico utilizado foi autoclavado, assim como os eppendorfs utilizados. Após a retirada, o hipocampo, hipotálamo e o córtex pré-frontal foram armazenados em eppendorfs e adicionado 1 ml de líquido fixador de RNA (RNA Later, SIGMA), para conservação do RNA presente nas estruturas. As amostras foram armazenadas em geladeira, a temperatura de 4 °C, até o envio para o Laboratório de Neurobiologia Molecular e Comportamental, Departamento de Ciências Fisiológicas, Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, coordenado pela Prof^a. Dra. Cristina Martins e Silva, para a realização dos ensaios descritos a seguir.

5.5.1 PCR Quantitativo em Tempo Real

A análise da expressão gênica para o BDNF, TNF- α e IL-1 β foi realizada de acordo com protocolo adotado por Martins-Silva e colaboradores (2011). Em uma série separada de experimentos, foram utilizados camundongos dos grupos: i) controle + veículo (10 ml/kg, i.g.), ii) controle + EHPp (0,1 mg/kg, i.g.), iii) TEPT + veículo (10 ml/kg, i.g.) e iv) TEPT + EHPp (0,1 mg/kg, i.g.). As amostras de hipocampo, hipotálamo e córtex pré-frontal foram processadas até a extração do DNA. O RNA total foi extraído usando reagente de isolamento de RNA (TRI, Sigma-Aldrich, MO, EUA). O DNA complementar (DNAc) foi sintetizado utilizando o kit de síntese de DNAc (iScript, BioRad, CA, EUA). Subsequentemente, o PCR (Reação em cadeia da polimerase) quantitativo (PCRq) foi realizado utilizando o CFX96 PCR em tempo real (BioRad, CA, EUA) e o iQ SYBR Green Supermix (BioRad, CA, EUA). A quantificação relativa da expressão gênica foi analisada pelo método $2^{-\Delta\Delta C_t}$, utilizando a expressão do gene da β -actina para normalizar os dados. Os genes escolhidos para a análise do RNA mensageiro, *primers* e tamanho do fragmento estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2: Genes para a análise por PCR quantitativo em tempo real e seus *primers* e tamanho do fragmento.

Gene	Par da sequência de primers 5'-3'	Tamanho do fragmento (pb)
TNF	GAG GTC AAT CTG CCC AAG TAC/CCT GAG CCA TAA TCC CCT TTC	202
GDNF	AAC GGT GTG GAT GTA TCT GAC/TTT TCT GTA GCT GGG CCT TC	213
IL-1β	ACG GAC CCC AAA AGA TGA AG/CAC GGG AAA GAC ACA GGT AG	169
BDNF	GCG CCC ATG AAA GAA GTA AA/TCG TCA GAC CTC TCG AAC CT	118

Fonte: A autora (2016).

5.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram analisados no programa Graph Pad Prism versão 6.01 (2012, San Diego, CA, USA). Os dados foram analisados para avaliação de normalidade utilizando o teste de *Shapiro – Wilk* ($P > 0,05$). Desta forma, os resultados estão expressos como média \pm erro padrão da média (E.P.M.). Para comparação entre dois grupos foi utilizado teste t de *student* não pareado. Para comparação entre mais de dois grupos, foi utilizada ANOVA de uma ou duas vias, e teste de *Bonferroni*. Valores de p menores que 0,05 ($p < 0,05$) foram considerados estatisticamente significativos.

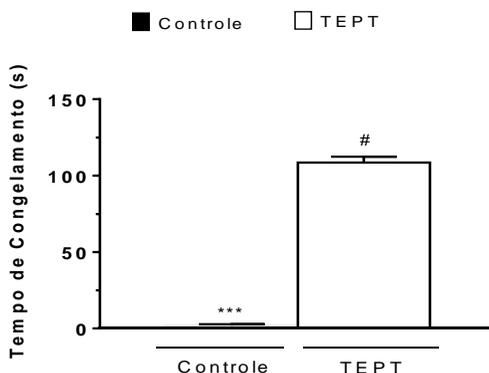
6 RESULTADOS

6.1 AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO DE MEDO E ANSIEDADE

Primeiramente, após a indução do modelo de TEPT, através da aplicação dos choques nas patas, o comportamento dos animais foi analisado, de modo a se aferir se o modelo era capaz de provocar alterações no comportamento dos animais e reproduzir algumas das características da sintomatologia do TEPT.

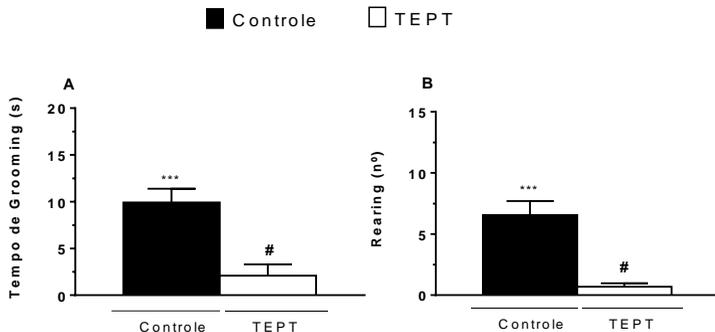
Foi observado que o protocolo de indução de TEPT foi capaz de promover alterações no comportamento dos animais ao serem reexpostos ao aparato, que passaram a apresentar elevado tempo de *freezing* (Fig. 11) e redução do tempo de *grooming* (Fig. 12A) e também na frequência do comportamento de *rearing* (Fig. 12B) em comparação ao grupo controle.

Figura 11: Influência das reexposições ao aparato, no comportamento de *freezing*, na primeira reexposição após os choques.



Legenda: Cada grupo representa a média de 6 animais e as linhas verticais o E.P.M. Paineis A, ANOVA de uma via seguida pelo teste de *Bonferroni*. *** $P < 0,001$.

Figura 12: Influência das reexposições ao aparato, nos comportamentos de *grooming* e *rearing*, na primeira reexposição após os choques.

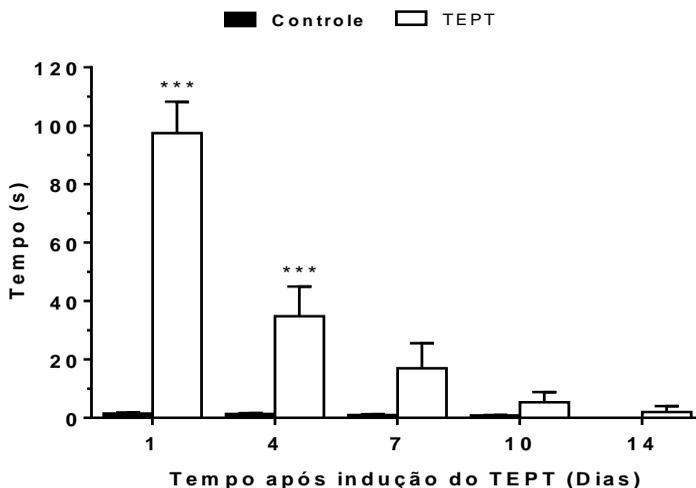


Legenda: Cada grupo representa a média de 6 animais e as linhas verticais o E.P.M. Painel A, ANOVA de uma via seguida pelo teste de *Bonferroni*. *** $P < 0,001$.

Após a verificação de que o protocolo era capaz de provocar alterações nos comportamentos dos animais, foram feitas novas avaliações, para verificar se as alterações comportamentais se mantinham ao longo do tempo.

Os dados apresentados na Fig. 13 mostram que os animais que passaram pelo protocolo de indução de TEPT e que foram reexpostos ao aparato de choque, 24 (1 dia) e 96 (4 dias) horas exibiram significativo comportamento de *freezing* em relação aos animais controle. Salienta-se que o grupo controle foi exposto ao aparato, na mesma sequência de dias, porém sem receber choques, e não apresentaram alterações comportamentais, como *freezing* ou diminuição da atividade exploratória, comportamentos característicos de medo e ansiedade. Além disto, pode-se observar que o comportamento de *freezing* estava presente de forma não significativa 168 (sete dias) horas após o choque, sendo completamente extinto 240 (dez dias) e 336 (quatorze dias) horas após a indução do modelo de TEPT quando comparado com o grupo controle [$F(1, 10) = 29,83$ ($P = 0,0003$)] (Fig. 11). Essa redução progressiva do comportamento de *freezing* é representada na Fig. 13, onde observa-se que a cada vez que o animal é reexposto ao aparato, o comportamento de *freezing* vai perdendo intensidade, até ser quase completamente extinto.

Figura. 13: Decurso temporal do comportamento de *freezing* pós choque.



Legenda: Os animais foram avaliados em diferentes tempos dentro do período de quatorze dias e comparados ao grupo reexposto sem choque, que não apresentou comportamento de *freezing* em nenhum dos pontos avaliados. Cada grupo representa a média de 6 animais e as linhas verticais o E.P.M. Os símbolos denotam os níveis de significância quando comparado ao grupo controle (Anova de duas vias de medidas repetidas seguida de teste de *Bonferroni*). *** $P < 0,001$.

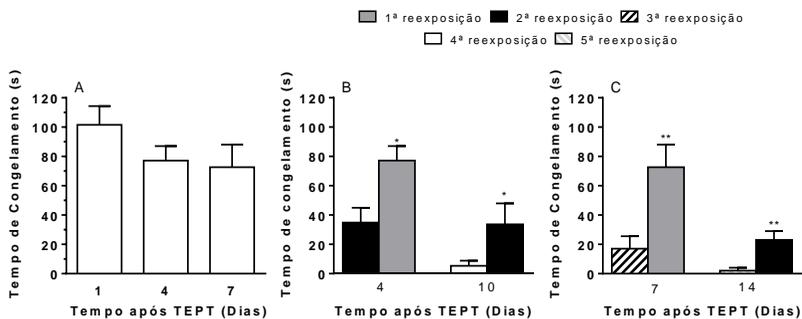
Assim, foi levantada as questões se o fator tempo, influenciaria na duração do comportamento de *freezing* e se este poderia ser inversamente proporcional ao número de vezes que o animal foi reexposto ao aparato após a indução do modelo de TEPT. Ademais, a diminuição do comportamento de *freezing* dos animais, decorrido algum tempo após a aplicação dos choques, poderia ser dependente do “esquecimento” do evento traumático.

Levando-se em consideração estas questões, foram feitas reexposições dos animais ao aparato, em diferentes tempos, de modo a se verificar se eram de fato as reexposições constantes ao aparato ou a passagem do tempo, que provocavam a diminuição do comportamento de *freezing* nos animais.

Observou-se que os animais reexpostos pela primeira vez, quatro ou sete dias após a indução do modelo de TEPT, apresentavam comportamento de *freezing* semelhante aos animais reexpostos 24 horas após [$F(2, 15) = 1,441, P = 0,267$] (Fig. 14A). Foi verificado também que o número de reexposições afeta de modo significativo na diminuição do

comportamento de *freezing*, já que a redução deste comportamento foi diretamente relacionada ao número de reexposições ao aparato [Dia quatro, uma reexposição ($77,17 \pm 9,92$) x duas reexposições ($34,83 \pm 10,12$), $P=0,013$]. (Fig. 14B e C).

Figura 14: Influência das reexposições ao aparato, no comportamento de *freezing*.



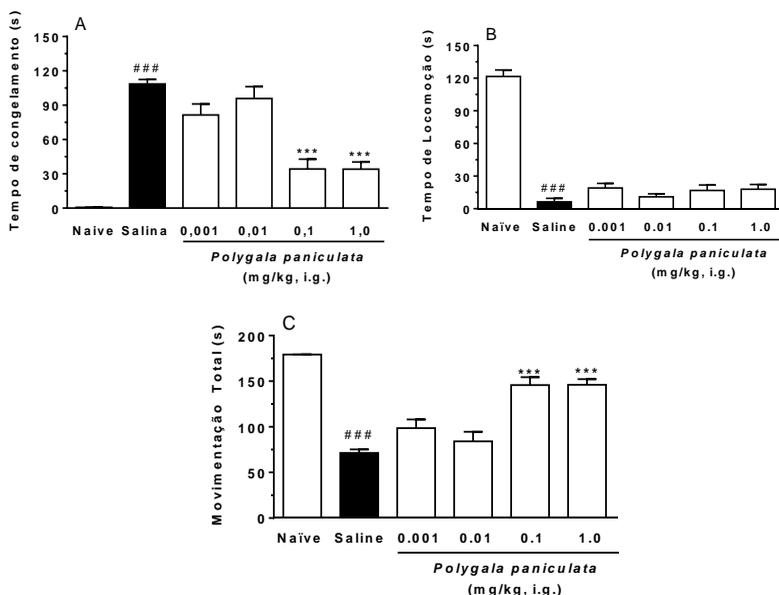
Legenda: Painel A, representa o comportamento de *freezing* na primeira reexposição após os choques, em diferentes períodos de tempo. Nos Painéis B e C, são mostradas as diferenças no tempo de *freezing* dos animais, quando comparados em diferentes números de reexposições. Cada grupo representa a média de 6 animais e as linhas verticais o E.P.M. Painel A, ANOVA de uma via seguida pelo teste de *Bonferroni*. Painel B e C, Teste *t* de *student* não pareado. ** $P < 0,01$; * $P < 0,05$.

6.2 EFEITO DO EHPp E DA SERTRALINA NO COMPORTAMENTO DE MEDO E ANSIEDADE DOS ANIMAIS SUBMETIDO AO TEPT

Inicialmente, foi observado que o EHPp promoveu redução significativa e dependente da dose do comportamento de *freezing* e consequentemente favoreceu o aumento da movimentação total dos animais submetido ao TEPT quando comparados com o grupo controle (Fig. 15A, B e C). Desse modo, os comportamentos de *freezing* e movimentação total foram selecionados, devido ao maior poder de predição comportamental apresentado por eles, já que o comportamento de *freezing* é o que indica de forma mais intensa e detectável, o comportamento de medo. Além disto, foi demonstrado que as doses de 0,1 e 1,0 mg/kg de EHPp promoveram a redução do comportamento de *freezing*, e aumento da movimentação total quando comparado com as doses de 0,001 e 0,01 e grupo controle [$F(5, 57) = 32,16$ ($P < 0,0001$)]

(Fig. 15A, B e C). Diante destes resultados, os experimentos posteriores foram realizados somente com a dose de 0,1 mg/kg de EHPP.

Figura 15: Efeito do EHPP na resposta comportamental de *freezing* (painel A), tempo de locomoção (painel B) e movimentação total (painel C) dos animais, 24h após serem submetidos ao protocolo de TEPT.

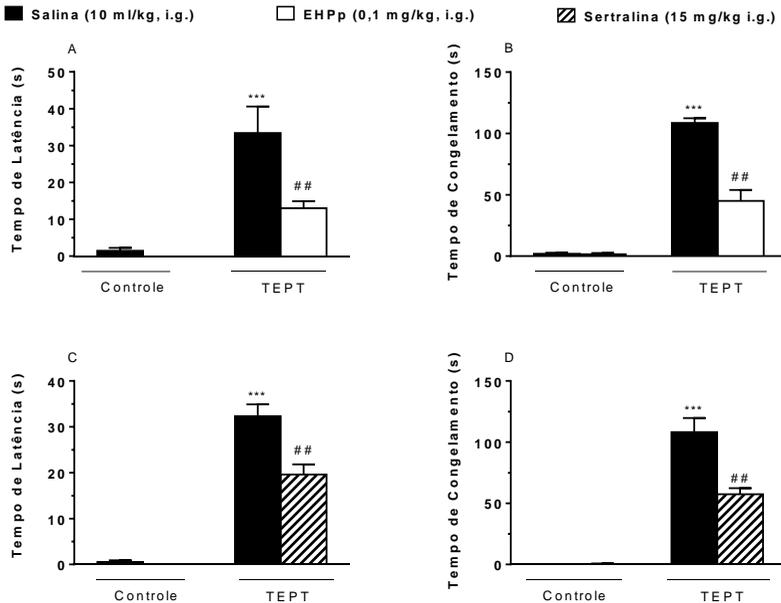


Legenda: Após o protocolo, os animais foram tratados com diferentes doses do EHPP (0,001-1,0 mg/kg i.g.). Cada grupo representa a média de 10 a 13 animais e as linhas verticais o E.P.M. (#) corresponde à diferença significativa entre os grupos salina e naive. (*) corresponde a diferenças significantes entre os grupos salina e grupos tratados. Anova de uma via, seguido pelo teste de *Bonferroni*. ### P < 0,001. *** P < 0,001.

Os dados apresentados na Fig. 16 mostram o efeito do tratamento dos animais com o EHPP (0,1 mg/kg, i.g.) ou com a sertralina (15 mg/kg, i.g.), utilizada como controle positivo, sobre o comportamento de latência e *freezing* (congelamento), após a reexposição do animal ao ambiente aversivo. Como demonstrado na Fig. 14A, o EHPP (0,1 mg/kg, i.g.) foi capaz de reduzir o tempo de latência para a saída do estado de *freezing* dos animais [F (1, 46) = 9,263 (P = 0003)], assim como reduziu também o tempo de duração deste comportamento [F (1, 46) = 40,99 (P < 0,0001)]

(Fig. 16B). Os animais tratados com sertralina (15 mg/kg, i.g.), utilizada como controle positivo, apresentaram redução significativa do comportamento de *freezing* [$F(1, 48) = 15,93$ ($P = 0,0002$)] (Fig. 16B), e também o tempo de latência dos animais quando comparado com o grupo controle [$F(1, 48) = 15,10$ ($P = 0,0003$)] (Fig. 16D).

Figura 16: Efeito do EHPp ou sertralina, na resposta comportamental dos animais, 24h após serem submetidos ao protocolo de TEPT.

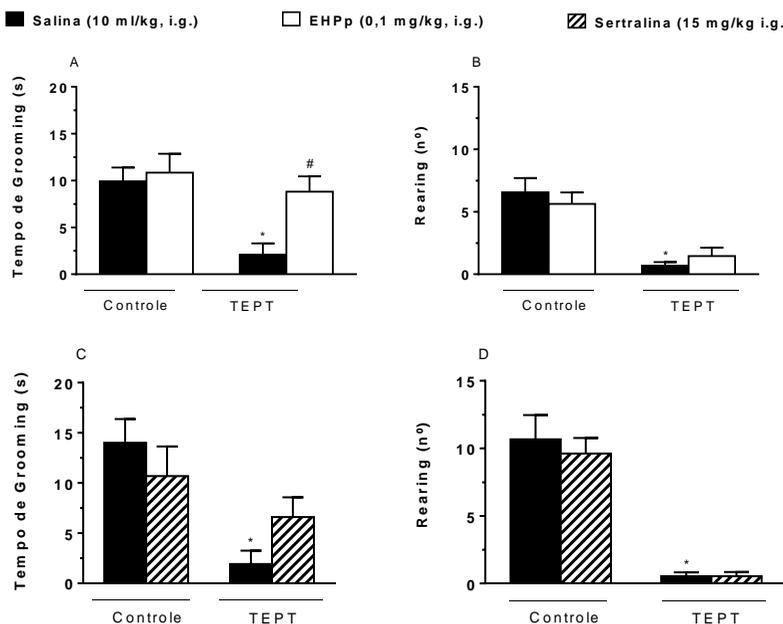


Legenda: Os painéis de A e B referem-se ao efeito do tratamento com EHPp. Os painéis de C e D, referem-se ao tratamento com sertralina. Cada grupo representa a média de 12 a 14 animais e as linhas verticais o E.P.M. Anova de duas vias seguida pelo teste de *Bonferroni*. *** $P < 0,001$, quando comparado ao grupo controle (veículo, EHPp ou sertralina). ## $P < 0,01$, quando comparado ao grupo TEPT (veículo).

Os dados representados na Fig. 17 indicam que os animais submetidos ao protocolo de TEPT apresentam redução significativa do comportamento de *grooming* e de *rearing* quando comparado com o grupo controle (Fig. 17A, B, C e D). No entanto, o EHPp (0,1 mg/kg, i.g.) foi capaz de aumentar de forma significativa o comportamento de *grooming* [$F(3, 44) = 5,41$ ($P = 0,024$), fator tratamento] (Fig. 17A), mas

não o de *rearing* dos camundongos submetido ao TEPT [F (1, 39) = 0,011 (P = 0,914), fator tratamento] (Fig. 17B). A sertralina (15 mg/kg, i.g.), utilizada como controle positivo, promoveu aumento, porém, não significativo, somente do comportamento de *grooming* [F (1, 48) = 0,096 (P = 0,757), fator tratamento] (Fig. 17C) e não promoveu alterações no *rearing* [F (1, 47) = 0,249 (P = 0,620), fator tratamento] (Fig. 17D).

Figura 17: Efeito do EHPp ou sertralina, na resposta comportamental dos animais, 24h após serem submetidos ao protocolo de TEPT.

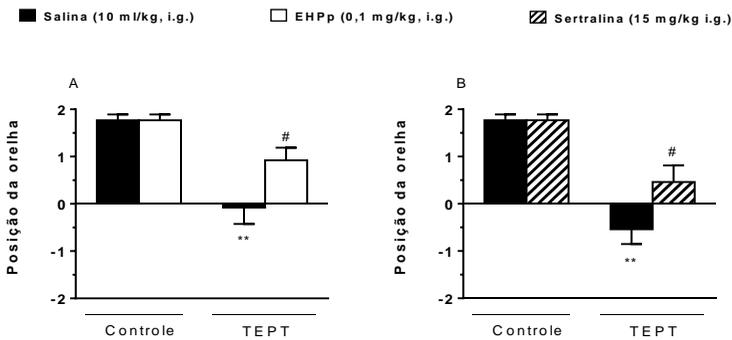


Legenda: Os painéis A e B referem-se ao efeito do tratamento com EHPp. Os painéis C e D, referem-se ao tratamento com sertralina. Cada grupo representa a média de 12 a 14 animais e as linhas verticais o E.P.M. Anova de duas vias seguida pelo teste de *Bonferroni*. *P < 0,05, quando comparado ao grupo controle (veículo, EHPp ou sertralina). ## P < 0,01 quando comparado ao grupo TEPT (veículo).

Com o intuito de se obter uma análise mais acurada do comportamento de medo e ansiedade, observou-se a posição da orelha dos animais com TEPT. Os resultados mostrados na Fig. 18 indicam que os animais submetidos ao TEPT apresentam o posicionamento da orelha

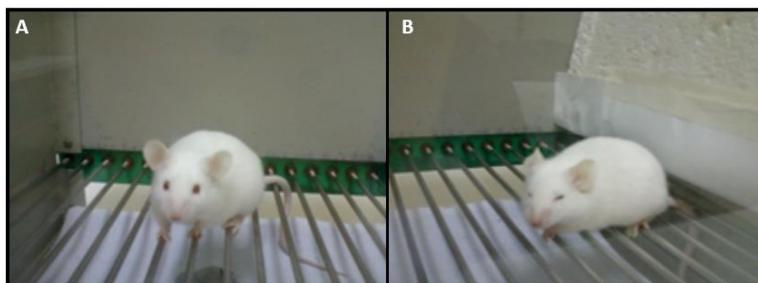
mais próxima do corpo, ou seja, elas estão retraídas quando comparados com o grupo controle (Fig. 19 A e B). Já os animais que foram submetidos ao TEPT e tratados com o EHPP [F (1, 48) = 4,52 (P = 0,038)] (0,1 mg/kg, i.g.) ou sertralina [F (1, 48) = 5,62 (P = 0,021)] (15 mg/kg, i.g.) apresentaram redução da retração da orelha quando comparado com o grupo TEPT (Fig. 18 A e B).

Figura 18: Posição da orelha dos animais, ao serem reexpostos ao aparato de choque, 24h após passarem pelo protocolo de indução do modelo de TEPT e serem tratados com EHPP ou sertralina.



Legenda: O painel A refere-se ao efeito do tratamento com EHPP. O painel B refere-se ao tratamento com sertralina. Cada grupo representa a média de 12 a 14 animais e as linhas verticais o E.P.M. Anova de duas vias seguida pelo teste de *Bonferroni*. **P < 0,01, quando comparado ao grupo controle (veículo ou EHPP). ##P < 0,01 quando comparado ao grupo TEPT (veículo).

Figura 19: Posição da orelha de animais submetidos ou não ao protocolo de TEPT.



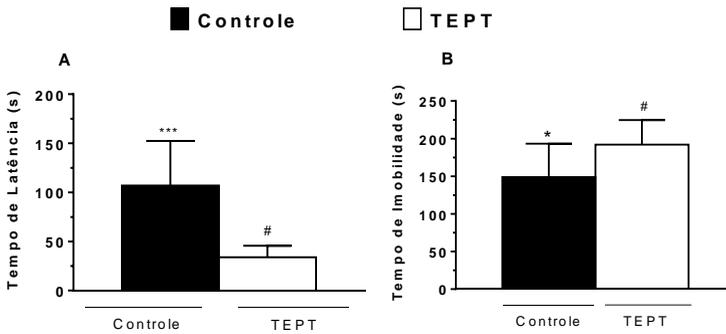
Legenda: Na imagem A, animal que não recebeu choque e foi apenas exposto ao aparato. Suas orelhas se apresentam elevadas e posicionadas para a frente, sendo esta a posição comumente observada nos camundongos. Na imagem B, observa-se um animal que recebeu choque 24h antes. Suas orelhas se mostram retraídas e posicionadas para trás, de modo a ficarem mais próximas do corpo do animal. Fonte: Imagem elaborada pela autora.

6.3 EFEITO DO EHPP E DA SERTRALINA NO COMPORTAMENTO TIPO DEPRESSIVO DOS ANIMAIS SUBMETIDO AO TEPT

Para se avaliar se o protocolo de choques seria capaz de induzir um comportamento tipo depressivo nos animais, foi realizado o teste do nado forçado.

Os dados apresentados na Fig. 20 mostram que os animais submetidos ao TEPT apresentaram diminuição no tempo de latência para o estado de imobilidade e aumento no tempo de duração do comportamento de imobilidade, quando comparado com o grupo controle. O que demonstra que os choques aplicados nas patas dos animais para indução do modelo de TEPT promoveram o comportamento tipo depressivo, presente nos indivíduos com TEPT.

Figura 20: Alterações comportamentais induzidas pelos choques nos animais no teste do nado forçado.

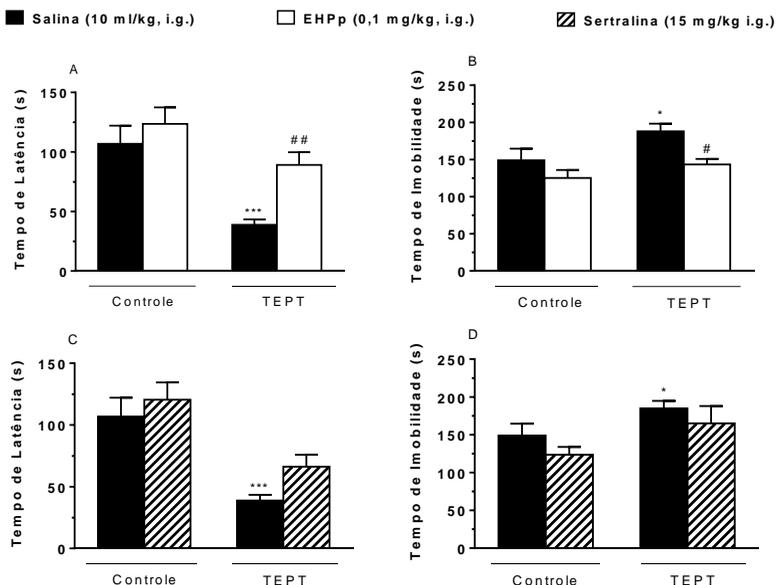


Legenda: Houve redução no tempo de latência para o comportamento de imobilidade (painel A) e aumento no tempo de imobilidade (painel B) apresentado pelos animais. Cada grupo representa a média de 10 a 13 animais e as linhas verticais o E.P.M. Anova de duas vias seguida pelo teste de *Bonferroni*. *** $P < 0,001$; * $P < 0,05$). ## $P < 0,01$ quando comparado ao grupo TEPT (veículo).

Posteriormente, foi avaliado se o EHPp seria capaz de prevenir as alterações comportamentais induzidas pelo TEPT.

Foi observado então que o EHPp foi capaz de promover, de forma significativa, aumento no tempo de latência, [$F(1, 36) = 8,05$ ($P = 0,007$)] (Fig. 21A), e redução do comportamento de imobilidade [$F(1, 36) = 9,47$ ($P = 0,004$)] (Fig. 21B). A sertralina, no entanto, não promoveu redução de forma significativa da latência [$F(1, 37) = 3,12$ ($P = 0,085$)] (Fig. 21C) e nem do tempo de imobilidade [$F(1, 38) = 1,89$ ($P = 0,176$)] (Fig. 21D).

Figura 21: Efeito do EHPP ou sertralina, no comportamento de imobilidade dos animais no teste do nado forçado, 24h após serem submetidos ao protocolo de TEPT.



Legenda: Os painéis de A e B referem-se ao efeito do tratamento com EHPP. Os painéis de C e D, referem-se ao tratamento com sertralina. Cada grupo representa a média de 10 a 13 animais e as linhas verticais o E.P.M. Anova de duas vias seguida pelo teste de *Bonferroni*. *** $P < 0,001$; * $P < 0,05$, quando comparado ao grupo controle (veículo, EHPP ou sertralina). ## $P < 0,01$ quando comparado ao grupo TEPT (veículo).

6.4 EFEITO DO EHPP E DA SERTRALINA NA MEMÓRIA AVERSIVA (ESQUIVA INIBITÓRIA)

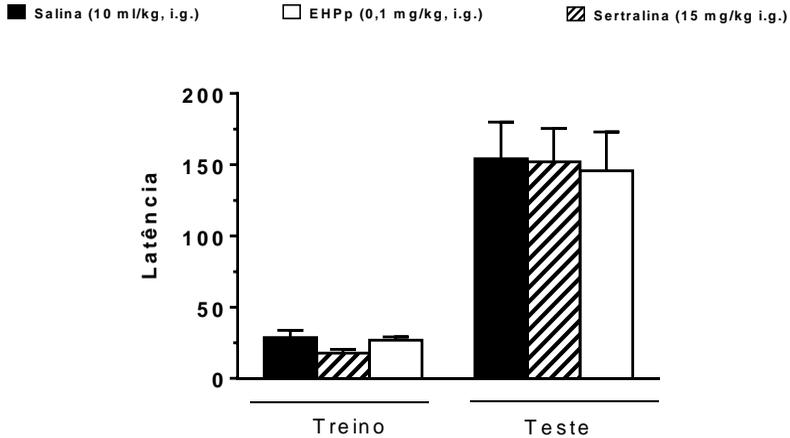
Este teste foi realizado com o intuito de verificar se o efeito do EHPP sobre a sintomatologia do TEPT estaria relacionado a modulação negativa do processo de aprendizagem e memória, associados a eventos emocionais.

Como demonstrado na Fig. 22, não houve redução do tempo de latência para a descida da plataforma pelos animais, assim como não houve diferença entre os grupos tratados, tanto com EHPP (0,1 mg/kg,

i.g.) quanto pela sertralina (15 mg/kg, i.g.) quando comparado com o grupo controle (salina) [$F(2, 15) = 0,06$ ($P = 0,933$)].

Estes resultados indicam que o efeito do EHPp e da sertralina no modelo do TEPT não dependem de uma ação inespecífica sobre mecanismos de memórias e aprendizagem, ou seja, um possível efeito amnésico do EHPp e/ou da sertralina.

Figura 22. Efeito do EHPp, sertralina ou salina, no teste de esquila inibitória.



Legenda: Cada grupo representa a média de 6 animais e as linhas verticais o E.P.M. Anova de duas vias seguida pelo teste de *Bonferroni*. Não houve diferença estatística entre os grupos tratados com EHPp, sertralina ou salina.

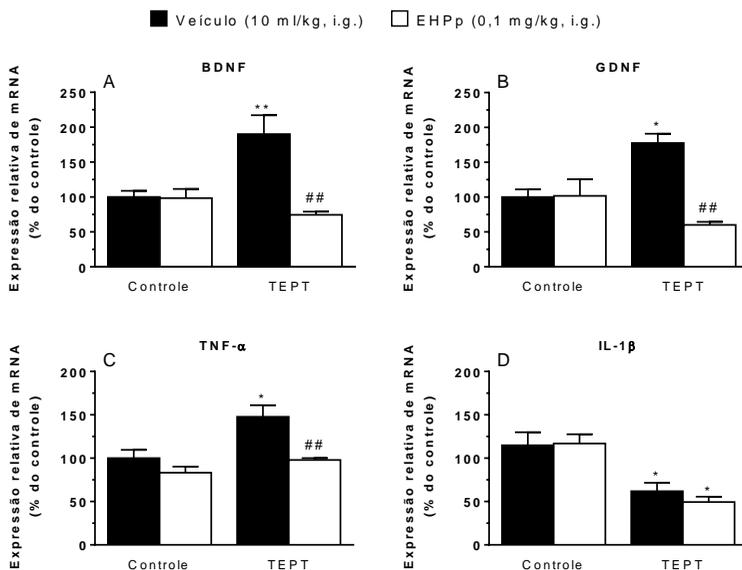
6.5 AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA “EX VIVO”

Para verificar se o protocolo de indução de TEPT foi capaz de induzir alterações bioquímicas em estruturas encefálicas dos animais, semelhantes às observadas em humanos, foi realizada a análise de qPCR, para verificação da expressão de RNAm de BDNF, GDNF, IL-1 β e TNF- α , no hipotálamo, córtex pré-frontal e hipocampo dos animais.

6.5.1 Efeito do modelo de TEPT e do EHPp na expressão do RNAm de BDNF, GDNF, IL-1 β e TNF- α no Hipotálamo

A Figura 23 destaca que a indução do modelo de TEPT foi capaz de promover significativo aumento na expressão do RNAm do BDNF, GDNF e TNF- α no hipotálamo dos camundongos, quando comparado com o grupo controle (Fig. 23A, B e C). Além disto, foi observado uma significativa redução na expressão do RNAm da IL-1 β no hipotálamo dos camundongos, quando comparado com o grupo controle (Fig. 23D). No entanto, os camundongos com TEPT que foram tratados com o EHPp (0,1 mg/kg, i.g.) apresentaram o restabelecimento (prevenção do aumento) na expressão do RNAm do BDNF [F (1, 14) = 16,40 (P = 0,001)], GDNF [F (1, 13) = 11,84 (P = 0,004)] e TNF- α [F (1, 13) = 11,42 (P = 0,004)] no hipotálamo quando comparado com o grupo controle (Fig. 23A, B e C). Contudo, o tratamento com o EHPp (0,1 mg/kg, i.g.) não foi capaz de restabelecer (prevenção da diminuição) a expressão do RNAm da IL-1 β no hipotálamo quando comparado com o grupo controle [F (1, 14) = 0,23 (P = 0,636)] (Fig. 23D).

Figura 23: Efeito do EHPp sobre a expressão do RNAm de BDNF (A), GDNF (B), TNF- α (C) e IL-1 β (D) no hipotálamo de camundongos que passaram ou não pelo protocolo de indução de TEPT.



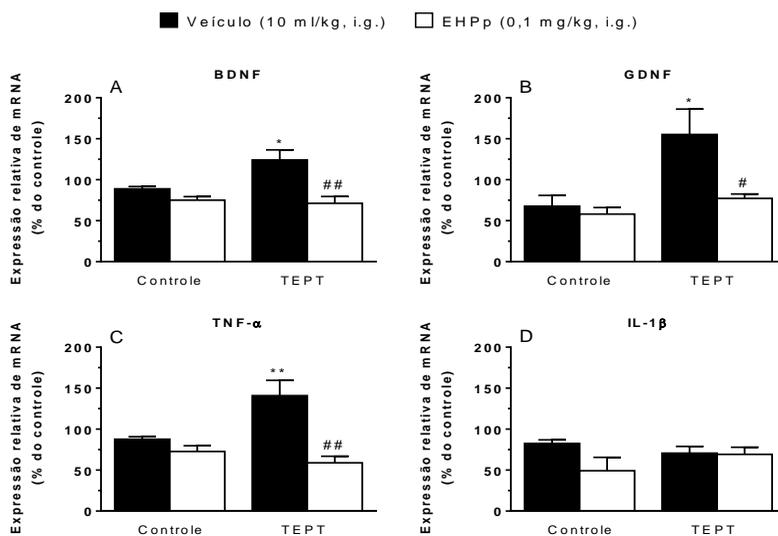
Legenda: Os dados são expressos como média \pm EPM de 4 a 5 animais por grupo, avaliados estatisticamente através de ANOVA de uma via seguida pelo teste de *Bonferroni*, ** $P < 0,01$; * $P < 0,05$, quando comparado ao grupo controle (veículo ou EHPp). ## $P < 0,01$ quando comparado ao grupo TEPT (veículo).

6.5.2 Efeito do modelo de TEPT e do EHPp na expressão do RNAm de BDNF, GDNF, IL-1 β e TNF- α no Córtex Pré-Frontal

No córtex pré-frontal, foi observado que a indução do modelo de TEPT promoveu significativo aumento na expressão do RNAm do BDNF, GDNF e TNF- α dos camundongos, quando comparado com o grupo controle (Fig. 24 A, B e C). Além disto, foi observado que a expressão do RNAm da IL-1 β não foi alterado de forma significativa no córtex pré-frontal dos camundongos quando comparado com o grupo controle (Fig. 24 D). Por outro lado, os camundongos com TEPT que foram tratados com o EHPp (0,1 mg/kg, i.g.) apresentaram o restabelecimento (prevenção do aumento) na expressão do RNAm do BDNF [F (1, 16) = 17,79 (P = 0,0007)], GDNF [F (1, 17) = 5,15 (P = 0,036)] e TNF- α [F (1, 16) = 20,05 (P = 0,0004)] no córtex pré-frontal quando comparado com o

grupo controle (Fig. 24 A, B e C). Contudo, o tratamento com o EHPp (0,1 mg/kg, i.g.) dos camundongos com TEPT não foi capaz de promover alteração na expressão do RNAm da IL-1 β [F (1, 18) = 2,96 (P = 0,102)] no córtex pré-frontal quando comparado com o grupo controle ou TEPT (Fig. 24D).

Figura 24: Efeito do EHPp sobre a expressão do RNAm de BDNF (A), GDNF (B), TNF- α (C) e IL-1 β (D) no córtex pré-frontal de camundongos que passaram ou não pelo protocolo de indução de TEPT.



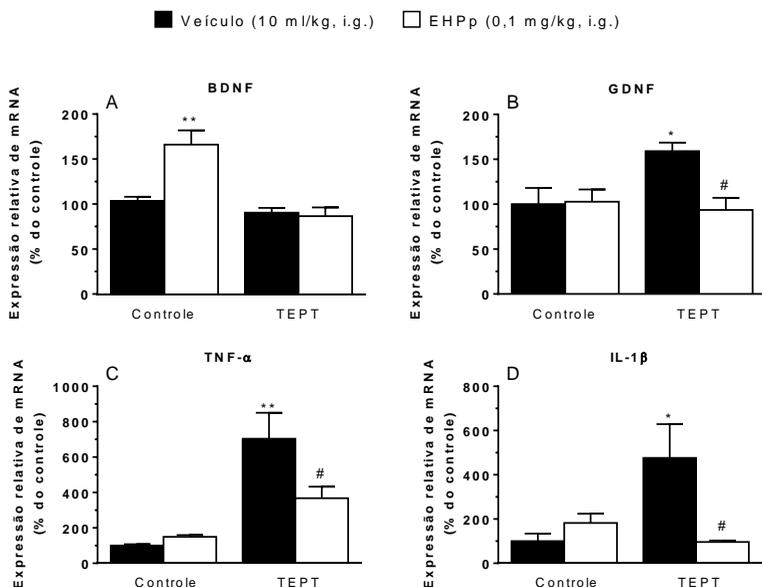
Legenda: Os dados são expressos como média \pm EPM de 4 a 5 animais por grupo, avaliados estatisticamente através de ANOVA de uma via seguida pelo teste de *Bonferroni*, **P < 0,01; *P < 0,05, quando comparado ao grupo controle (veículo ou EHPp). #P < 0,05 e ##P < 0,01 quando comparado ao grupo TEPT (veículo).

6.5.3 Efeito do modelo de TEPT e do EHPp na expressão do RNAm de BDNF, GDNF, IL-1 β e TNF- α no Hipocampo

A Figura 25 destaca que a indução do modelo de TEPT não promoveu alteração na expressão do RNAm do BDNF no hipocampo dos camundongos, quando comparado com o grupo controle (Fig. 25A). Interessantemente, os camundongos tratados com o EHPp (0,1 mg/kg, i.g.) apresentaram aumento na expressão do RNAm do BDNF no

hipocampo quando comparado com o grupo controle e TEPT [F (1, 17) = 9,56 (P = 0,006)] (Fig. 25A). No entanto, foi observado o aumento na expressão do RNAm do GDNF, TNF- α e IL-1 β no hipocampo dos camundongos com TEPT quando comparado com o grupo controle (Fig. 25B, C e D). Ademais, os camundongos com TEPT que foram tratados com o EHPp (0,1 mg/kg, i.g.) apresentaram o restabelecimento (prevenção do aumento) na expressão do RNAm do GDNF [F (1, 17) = 5,37 (P = 0,033)], TNF- α [F (1, 12) = 0,59 (P = 0,456)] e da IL-1 β [F (1, 10) = 4,33 (P = 0,063)] no hipocampo quando comparado com o grupo controle (Fig. 25 B, C e D).

Figura 25: Efeito do EHPp sobre a expressão do RNAm de BDNF (A), GDNF (B), TNF- α (C) e IL-1 β (D) no hipocampo de camundongos que passaram ou não pelo protocolo de indução de TEPT.



Legenda: Os dados são expressos como média \pm EPM de 4 a 5 animais por grupo, avaliados estatisticamente através de ANOVA de uma via seguida pelo teste de *Bonferroni*, **P < 0,01; *P < 0,05, quando comparado ao grupo controle (veículo ou EHPp). #P < 0,05 quando comparado ao grupo TEPT (veículo).

7 DISCUSSÃO

A evolução dos estudos sobre a memória mescla-se com a narrativa da busca humana pela compreensão do cérebro (MUKAMAL, MOREIRA, CARRASCO, 2012). Aristóteles foi quem primeiro descreveu a fisiologia da memória. Para ele, o armazenamento da memória era feito no coração, não no cérebro, e as sensações externas passariam do órgão sensorial para o coração por intermédio da *pneuma*, que era então movimentada pelo “espírito animal”. Ao chegar ao coração, era transformada em ideias e a sua permanência, chamada de memória (MUKAMAL, MOREIRA, CARRASCO, 2012).

Atualmente, a memória é entendida como uma grande rede de conexões, que mediante informações adquiridas da experiência individual, juntamente com o estímulo apresentado, é capaz de responder prontamente à função exigida (BEAR et al., 2002). Ela refere-se à persistência do aprendizado, e o aprendizado, à aquisição de uma nova informação.

A informação pode ser perdida por interferência, destruição ou ambas, sendo o modo como são processadas capaz de afetar diretamente a facilidade com que são lembradas. Existe a chamada aprendizagem associativa, onde a previsão de relação entre um estímulo e outro, ou entre comportamento e consequência é aprendido. Tal aprendizado pode formar relações essenciais que ajudam a adaptar suas ações ao ambiente (MUKAMAL, MOREIRA, CARRASCO, 2012).

No presente estudo, foi observado que as reexposições dos animais ao contexto aversivo são capazes de modificar a resposta comportamental que estes apresentam, ou seja, o comportamento de medo (*freezing*) é extinto pela reexposição (Fig. 11). De fato, a primeira reexposição é marcada por uma forte resposta de medo, com alto tempo de *freezing*, porém, essa resposta ao longo de novas reexposições vai decaindo progressivamente. Novas informações vão sendo adicionadas ao referencial que os animais possuem em relação ao ambiente, de modo que cada reexposição reforça o novo aprendizado, e consequentemente, a nova resposta, que vai se mostrando mais forte. O ambiente que anteriormente oferecia perigo, já não o apresenta mais. O que se apresenta não é um esquecimento do evento traumático, que originou a resposta de medo, mas sim, a adição de novas informações, que demonstram ausência de perigo, o que proporciona a redução da necessidade de comportamento defensivo ou resposta intensa de medo (GIUSTINO, MAREN, 2015).

Assim, salienta-se que são as reexposições ao ambiente não mais aversivo as responsáveis pela diminuição da resposta de medo. Este fato

foi confirmado no presente estudo, o qual mostrou que os animais reexpostos pela primeira vez, vinte e quatro horas, quatro ou sete dias após a aplicação dos choques (estímulo aversivo), apresentam robusta resposta comportamental de medo, sendo elas na mesma intensidade. Observa-se também que ao se fazer um comparativo, entre o tempo decorrido e o número de reexposições feitas ao aparato, percebe-se que é o número de reexposições e não o tempo, que promove a expressiva diminuição da resposta de medo. As constantes reexposições promovem, portanto, a extinção do medo (Fig. 13).

A extinção do medo, processo originalmente descrito por Pavlov (1927), implica repetidas exposição a estímulos que provocam ansiedade para estabelecer uma nova memória que contraria a memória de medo original. Esse processo é altamente relevante para distúrbios de medo, ansiedade e relacionados com traumas que estão associados a reações emocionais negativas desencadeadas por objetos específicos, situações ou percepções internas e externas, e que são excessivas para o perigo apresentado. Além disso, nos animais a extinção é semelhante às formas de processamento aplicados em algumas abordagens psicoterápicas, que utilizam a exposição a estímulos relacionados e provocadores de ansiedade como formas de tratamento para atenuação da ansiedade (FITZGERALD, SEEMANN, MAREN, 2014).

Entre este tipo de abordagem psicoterapêutica, encontra-se a chamada Exposição Prolongada, bastante utilizada no tratamento de TEPT, que tem como base a reexposição ao ambiente traumático ou reexperimentação das emoções relacionadas ao trauma (BUTLER et al., 1984). No entanto, embora apresente bons resultados, alguns estudos têm demonstrado haver um alto número de evasão dessa forma de tratamento, sendo entre as razões encontradas a piora dos sintomas, ideação suicida, comportamento dissociativo e recusa no envolvimento de uma exposição imaginária. Salienta-se, porém, que estas não foram as únicas causas de evasão e outras causas foram encontradas também, como sensação de melhora e de não necessitar mais de tratamento, envolvimento com outras formas de tratamento, problemas pessoais e de tempo entre outros (NAJAVITS, 2015)

É de grande interesse tanto para profissionais de saúde mental quanto para os pacientes a maximização da eficácia da terapia (FITZGERALD, SEEMANN, MAREN, 2014). A complementação dos efeitos de tratamentos psicoterapêuticos pode ocorrer através da adoção de abordagens farmacológicas, que já foram mostradas poderem melhorar a aprendizagem e a extinção do medo relacionado a memórias

traumáticas, além de potencializar os efeitos de psicoterapia com base na extinção do medo (CHOI et al., 2010).

Atualmente, o tratamento tido como padrão ouro para o TEPT consiste na combinação TCC e ISRS, porém, estes alcançam apenas algo em torno de 50% de remissão completa dos sintomas. A baixa resposta aos tratamentos atuais existentes, tem motivado a constante procura por novas formas de tratamento para o TEPT, tanto psicoterápicas quanto farmacológicas, que se mostram essenciais no tratamento dessa patologia (NAJAVITS, 2015).

Como é possível observar na Fig. 16, o tratamento tanto com o EHPp quanto com o controle positivo, sertralina, promoveu diminuição na resposta de medo dos animais, quando reexpostos ao aparato. O extrato causou diminuição do tempo de latência desses animais para saírem do estado de *freezing* e se movimentarem pela primeira vez pelo aparato, assim como do tempo total de *freezing* apresentado. A diminuição desse tempo pode ser compreendida como uma menor intensidade na resposta de medo apresentada pelos animais, quanto ao ambiente. Sugere-se que o efeito do EPP não age através de um efeito amnésico inespecífico, como foi mostrado na Fig. 22, através do experimento de esquiva inibitória, mas sim na resposta comportamental de medo, que se mostra atenuada. Porém, embora a resposta de medo em relação ao ambiente tenha diminuído na intensidade, a memória referente ao evento traumático persiste, o que invocaria a necessidade de ainda se manter comportamentos defensivos.

A avaliação da posição da orelha dos animais tratados que receberam choques indicou haver diferenças entre os grupos que não receberam choques. Os animais tratados com EHPp e também com a sertralina, a apresentaram menos curvada, quando comparado aos animais tratados com salina, o que, baseando-se no trabalho de Lecorps e Féron (2015), pressupõe-se ser um indicativo de menor reatividade ao ambiente. No entanto, apesar das observações feitas indicarem maior reatividade dos animais com TEPT, este parâmetro comportamental ainda necessita de estudos mais precisos, que possam confirmar de fato a correspondência feita entre o comportamento apresentado pelos animais e a emoção sentida por eles.

Estudos têm demonstrado correlações entre aumento da ansiedade, redução da liberação de dopamina na amígdala e alterações no comportamento de *grooming*, assim como, aumento da ação de *grooming* quando ocorre estimulação do hipotálamo, seja através de estímulos elétricos locais ou através de drogas (KALUEFF et al., 2016). Desse modo, o comportamento de *grooming* se mostra interessante ao presente trabalho, devido a influência que o estresse exerce na frequência em que

ocorre e devido também ao envolvimento de áreas encefálicas, tais como amígdala e hipotálamo e o sistema hipotálamo-hipófise, que são relacionados tanto com a fisiopatologia do TEPT quanto com a ocorrência deste comportamento (KALUEFF et al., 2016).

No presente estudo, o comportamento de *grooming* se mostrou reduzido nos animais com TEPT, porém, os animais tratados com EHPp mas não os tratados com sertralina, mostraram uma prevenção parcial dessa redução. O comportamento de *grooming* é mediado também pela dopamina e alterações em sua concentração podem provocar alterações na expressão deste comportamento (KALUEFF et al., 2016). Assim, é possível sugerir que o EHPp pode estar promovendo a redução do comportamento de medo e ansiedade por aumentar a transmissão dopaminérgica em áreas encefálicas relacionadas ao TEPT. Tal hipótese pode ser corroborada pelo estudo de Bettio et al. (2011), o qual mostrou que o efeito tipo antidepressivo do EHPp parece ser dependente também da participação dos receptores dopaminérgicos D1 e D2. Embora não se possa afirmar que seja essa a causa da prevenção da redução do tempo de *grooming* nos animais com TEPT, é uma possibilidade a ser investigada posteriormente, através de experimentos adicionais.

Os comportamentos de *rearing* e *climbing*, caracterizam comportamentos exploratórios e se apresentaram diminuídos nos animais após receberem os choques, como é mostrado na Fig. 17. A diminuição no comportamento exploratório, é compreendido como uma resposta defensiva de medo, visto que os camundongos adotam comportamentos de imobilidade para se protegerem de ameaças inescapáveis (ANKUR, MAHESH e BHATT, 2013). Neste caso, ambos os tratamentos, EHPp e sertralina, não foram capazes de prevenir a sua diminuição.

No presente estudo, foi observado que os animais tratados, após decorrido um curto intervalo de tempo após serem recolocados no aparato, passam a apresentar, ainda que de forma reduzida, pequenos movimentos, entre eles o movimento da cabeça e movimento de avaliação de risco, em que o animal avança e recua com o corpo. Tais comportamentos podem denotar uma maior capacidade de avaliação de risco do ambiente, em comparação aos animais controles. Quando decorrido um tempo sem a apresentação de choques no aparato, os animais tratados apresentavam uma atenuação do comportamento de medo e conseqüente diminuição da resposta defensiva, o que não ocorria nos animais que receberam apenas veículo, que durante todo o tempo da reexposição apresentam alto tempo de *freezing* e pouca ou nenhuma movimentação.

A realização de análise de PCR para a expressão de RNAm das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e TNF- α , mostrou diminuição da expressão de RNAm de IL-1 β no hipotálamo de animais com TEPT, quando comparado aos grupos controles, tanto no grupo salina quanto no grupo tratado com EHPp. Foi mostrado haver também aumento do RNAm de TNF- α no hipotálamo dos animais do grupo tratado com salina, porém o EHPp foi capaz de prevenir esse aumento. No CPF não houve alteração na expressão de IL-1 β , tanto nos grupos que receberam choque quanto nos grupos que não receberam. Houve alteração somente na expressão de TNF- α , que se mostrou elevada nos animais que receberam choque e foram tratados com salina, tendo sido mostrado que o EHPp foi capaz de prevenir o aumento da expressão do RNAm para esta citocina.

Estes resultados condizem com dados encontrados na literatura, que demonstram haver influência do sistema imunológico na resposta comportamental (DANTZER et al., 2008; JONES, THOMSEN, 2013; PACE, HEIM, 2011). A resposta inflamatória exacerbada origina o chamado comportamento de doença, que tem como características comportamentais a imobilidade, redução de locomoção e exploração, redução no consumo de alimentos, além de outros comportamentos. Ainda associado ao aumento de citocinas, estudos com roedores sugerem que sua ação no cérebro pode promover mudanças na circuitaria cerebral que está envolvida na mediação da ansiedade (PACE, HEIM, 2011). Além disso, acredita-se estar a produção de citocinas pró-inflamatórias estreitamente envolvida em grandes mudanças de humor, tais como a depressão (STEPANICHEV et al., 2014). Somado a esses fatores, a frequência e gravidade dos sintomas de TEPT, tais como revivescência, esquiva e excitação, foram correlacionados com aumento das concentrações circulantes de TNF- α (von KANEL et al., 2007). Analisando-se de forma conjunta, estes resultados mostram que as ações de citocinas possuem estreita relação com os sintomas de TEPT e que a atenuação encontrada nas respostas comportamentais dos animais pode ser decorrente da diminuição da expressão destas citocinas, encontradas nos animais tratados com EHPp.

Essa mediação ocorre através de experiências passadas, que funcionam como um banco de dados. Baseando-se nessas experiências, o CPF define qual a melhor forma de se responder a uma situação específica. Porém, no TEPT essa atuação é falha. Estudos realizados em voluntários saudáveis mostraram que a ativação do CPFm juntamente com o hipocampo correlaciona-se com o sucesso de extinção do medo e que essa ativação é dependente do contexto (KALISCH et al., 2006; MILAD et al., 2007). Porém, essa atividade é diminuída em pacientes

com TEPT, contribuindo ainda mais para os déficits de extinção (MILAD et al., 2009). A disfunção exibida pelo CPF, resulta em uma incapacidade em se diferenciar situações seguras ou com semelhanças com a situação traumática, mas que não oferecem o risco que ela ofereceria, com situações de perigo real (ARNSTEN et al., 2015).

A desregulação do CPF afeta o funcionamento de outras estruturas também. O CPF é responsável por sinalizar situações de perigo à amígdala (ARNSTEN et al., 2015; QUIRK e MUELLER, 2008), que por sua vez sinaliza ao hipotálamo. Desse modo, a desregulação de sua ação resulta em ativações desnecessárias e incongruentes destas áreas. A sinalização de perigo ao hipotálamo promove a liberação do hormônio CRH, que por sua vez promove a liberação de ACTH, que induzirá a síntese e liberação de cortisol e este irá atuar no córtex da glândula adrenal (ARNSTEN et al., 2015). Quando em uma situação de perigo, essa resposta é parte do funcionamento normal do organismo e é extremamente necessária para a sobrevivência, porém, em uma situação em que não há perigo real, o desencadeamento dessa reação gera perturbações de ordens física e emocional nos indivíduos acometidos.

No hipocampo dos animais expostos aos choques, foram encontradas aumento do RNAm de IL-1 β e TNF- α , tendo sido este aumento prevenido pelo tratamento com EHPp. O aumento destas citocinas tem sido associado também a desregulação da ação do hipocampo. Ademais, o hipocampo é responsável pelo armazenamento de memórias e aquisição do aprendizado, e alteração no seu funcionamento pode estar associado a má incorporação das memórias aversivas às memórias normais. Essa má incorporação pode ser a responsável pelas *flash backs* que indivíduos com TEPT sofrem, além de dificultar a formação de novas memórias, que sinalizam não haver mais perigo nos locais ou situações que remetam a situação traumática. Sem a possibilidade de incorporação de novas memórias, que promovem a extinção do medo relacionado ao trauma vivenciado, o indivíduo se mantém em uma constante rememoração do evento, com conseqüente rememoração das emoções vivenciadas, resultando na revivência do medo.

No entanto, o EHPp se mostrou capaz de prevenir o aumento do RNAm da IL-1 β e do TNF- α , de níveis fisiológicos, que são necessários para o funcionamento adequado do organismo, para níveis patofisiológicos. Baseado nos estudos anteriores de Lapa et al. (2008), estima-se que esse efeito seja mediado principalmente pela presença da rutina, componente presente no extrato e que tem sido demonstrado possuir capacidade de redução, ou prevenção de aumento, das

concentrações de IL-1 β e TNF- α . Salienta-se que no estudo citado, a ação do EHPp foi mais eficaz do que a rotina isolada, o que denota o envolvimento de outros compostos do EHPp nesta ação.

A depressão é uma das doenças mentais mais prevalentes e que apresenta grande comorbidade com o TEPT. Vários estudos têm demonstrado ligações entre alterações no complexo hipotálamo-adrenal, na produção de citocinas pró-inflamatórias e neurotrofinas, sendo essas alterações envolvidas em expressivas mudanças de humor (STEPANICHEV et al., 2014). A anedonia, anorexia, perda de peso corporal, e redução da atividade locomotora, exploratória e de comportamentos sociais são importantes componentes do estado tipo-depressivo observado em animais, induzido por ativação imune, no chamado comportamento de doença. Foi observado que a indução desse comportamento, através de injeções de LPS, resulta no aumento da expressão local do RNAm de IL-1 β , IL-6, e TNF- α no hipotálamo. Estes dados vão ao encontro dos resultados encontrados no presente estudo, em que também foi observado aumento no RNAm de TNF- α no hipotálamo dos animais com TEPT.

Nos animais controles tratados com EHPp foi observado aumento na expressão do RNAm de BDNF no hipocampo, porém, não foram encontradas alterações nas concentrações dos grupos com TEPT. O estresse crônico induz alterações atróficas em sub-regiões do hipocampo e volume reduzido do hipocampo foi relatado em casos de depressão e TEPT (JEON e KIM, 2016; WANG et al., 2010). A sinalização de BDNF é vital para a neurogênese no hipocampo (GREEN, CORSI-TRAVALI, NEUMEISTER, 2014). Tendo o extrato mostrado efeito no aumento dessa sinalização, essa é uma propriedade a ser explorada no tratamento de patologias em que a redução da concentração de BDNF está envolvida.

Curiosamente, o BDNF se mostrou elevado no hipotálamo e no CPF dos animais do grupo TEPT tratados com salina. Porém, os animais com TEPT, tratados com EHPp apresentaram expressão do RNAm para BDNF semelhante aos dos grupos controle. Embora estudos apontem para os efeitos benéficos e protetores do BDNF, Green, Corsi-Travali e Neumeister (2013), fazem a ressalva de que o aumento da sinalização de BDNF poderia teoricamente aumentar o risco de desenvolvimento de TEPT, se estiverem presentes em certas áreas do cérebro, como a amígdala, durante o processo de aquisição do medo. Os autores sugerem que a sinalização desregulada de BDNF pode interferir no funcionamento normal do córtex anterior cingulado e da amígdala, levando a respostas de medo elevadas, o que poderia contribuir para o desenvolvimento potencial de TEPT. Essa hipótese é corroborada por Yu e Chen (2011),

que apontam que o BDNF, ao contrário do que demonstra sua atuação no hipocampo, pode agravar sintomas depressivos ou de ansiedade, ao atuar dentro de um circuito específico, como a área tegmental ventral (VTA) ou núcleo accumbens.

Desse modo, a prevenção do aumento de BDNF promovida pelo EHPp, poderia contribuir para a regulação do funcionamento destas estruturas, que sabidamente, se mostram alteradas no TEPT.

O GDNF, por sua vez, apresentou aumento da expressão do RNAm no hipotálamo, CPF e hipocampo dos animais do grupo TEPT tratados com salina, sendo esse aumento prevenido pelo EHPp nas três estruturas analisadas. É considerado um neuroprotetor essencial para neurônios dopaminérgicos do mesencéfalo (NITTA et al., 2004), além de promover o desenvolvimento e a diferenciação de neurônios dopaminérgicos (GRANHOLM et al., 2010).

A associação entre perturbações do humor e o sistema monoaminérgico, incluindo a dopamina, são bem estabelecidos (KOTYUK et al., 2013) e alterações na regulação de sua expressão foram associadas a várias doenças neuropsiquiátricas, tais como a esquizofrenia e a depressão através da desregulação de circuitos neuronais dopaminérgicos e plasticidade sináptica deficiente (AIRAKSINEN e SAARMA, 2002). No entanto, o papel desempenhado pelo GDNF nos transtornos de humor ainda é pouco conhecido e necessita de mais estudos para sua melhor compreensão. Os dados encontrados no presente trabalho, denotam um possível envolvimento do GDNF na atuação do EHPp na atenuação da sintomatologia associada ao TEPT. Sendo a depressão uma das principais comorbidades encontrada em indivíduos diagnosticados com TEPT e tendo a desregulação de monoaminas, inclusive a dopamina, participação no desenvolvimento deste transtorno, pressupõe-se que possa haver um envolvimento do GDNF nesse processo.

Alguns estudos realizados com o intuito de investigar possíveis relações entre GDNF e transtornos de humor, como depressão e transtorno bipolar, foram inconclusivos, devido às contradições nos resultados obtidos. O aumento na concentração plasmática do GDNF foi encontrada por Wang e colaboradores (2011) e Rosa e colaboradores (2006), enquanto Tseng, Lee, Lin (2013) encontraram concentrações diminuídas. Embora os resultados encontrados até o presente momento não contribuam de forma consistente na elucidação do papel do GDNF nos transtornos de humor, a investigação envolvendo sua atuação no TEPT deve ser investigada posteriormente, através de experimentos adicionais.

No teste do nado forçado, os animais expostos aos choques apresentaram maior tempo de latência e de imobilidade quando comparados ao grupo controle, o que indica a presença de comportamento tipo depressivo nestes animais. Ademais, o EHPp foi capaz de aumentar o tempo de latência e diminuir o de imobilidade nos animais com TEPT. Essa diminuição pode estar associada à redução da expressão do RNAm de TNF- α , que já foi mostrado estar relacionado ao aumento da imobilidade no teste de nado forçado (KASTER et al., 2012). Foi mostrado também, no trabalho de O'Connor e colaboradores (2009), que injeções intraperitoneais de LPS aumentam a imobilidade dos animais no teste do nado forçado, porém esse efeito mostrou ser revertido pela administração de minociclina.

A minociclina é uma tetraciclina de segunda geração com efeitos anti-microbianos, anti-inflamatórios, anti-apoptóticos e neuroprotetiva (YONG et al., 2004; KIM e SUH, 2009; GARRIDO-MESA et al., 2013). Entre seus efeitos cita-se a promoção da neurogênese e neuroplasticidade, redução do estresse oxidativo e excitotoxicidade induzida pelo glutamato e atenuação da diminuição da serotonina, dopamina, norepinefrina e seus derivados (LEV KOVITZ et al., 2014). Embora os mecanismos exatos pela qual a minociclina exerce estes efeitos não são completamente compreendidos, sugere-se que sua ação iniba a ativação e proliferação de uma variedade de células imunes. Os modelos animais de transtornos psiquiátricos, incluindo depressão (MOLINA-HERNÁNDEZ et al., 2008; ARAKAWA et al., 2012), ansiedade (NEIGH et al., 2009) e esquizofrenia (LEV KOVITZ et al., 2007) sugerem que o uso da minociclina, pode ser benéfico para o tratamento dessas condições.

Levkovitz e colaboradores (2014) mostraram os efeitos da minociclina em um modelo agudo de TEPT, em que animais 24h após serem expostos a uma situação de estresse extremo (odor de predador) e serem tratados com uma única dose desse fármaco, apresentaram redução no tempo de *freezing* ao serem reexpostos ao contexto aversivo. Foi mostrado também redução nas concentrações de IL-1 β , IL-6 e TNF- α no hipotálamo, hipocampo e córtex frontal desses animais. Desta forma, os efeitos do EHPp em muito se assemelham aos da minociclina, que tem se mostrado como uma potencial abordagem terapêutica no tratamento de doenças neuropsiquiátricas relacionadas à neuroinflamação, inclusive a associada ao TEPT.

Os efeitos do extrato na resposta comportamental se assemelharam em muito aos efeitos da sertralina. O trabalho de Sitges, Gómez e Aldana (2014) mostrou ser a sertralina capaz de reduzir a expressão de RNAm

para $IL-1\beta$ e $TNF-\alpha$ no hipocampo de ratos. O que aproxima ainda mais os efeitos do extrato aos da sertralina.

Tendo sido mostrado o importante papel desempenhado pelo sistema imune nas patologias neuropsiquiátricas e tendo estas, grande incidência na população e impacto na qualidade de vida das pessoas acometidas, investigações que colaborem para o desenvolvimento de novos fármacos, com alvo no sistema imune, são de grande relevância.

Os efeitos do EHPp mostrados no presente trabalho, na prevenção do aumento do RNAm de citocinas pró-inflamatórias ($IL-1\beta$ e $TNF-\alpha$) e de fatores neurotróficos (BDNF e GDNF) são bastante relevantes, principalmente ao se pensar em tratamentos preventivos, administrados logo após o evento traumático. A redução da elevação desses marcadores inflamatórios poderia prevenir ou atenuar a ocorrência de alguns dos sintomas encontrados no TEPT, diminuindo a intensidade dos sintomas e os prejuízos por ele gerados.

No entanto, apesar dos resultados positivos encontrados no presente trabalho, julga-se necessário a continuação e ampliação destes estudos, com a finalidade de se caracterizar de forma mais concisa os resultados encontrados e explorar melhor as possibilidades de ação oferecidas pelo EHPp.

Assim, o presente estudo forneceu a base para possíveis usos do EHPp no tratamento do TEPT e outras patologias neuropsiquiátricas, no entanto, uma melhor caracterização de seus efeitos é necessária, visto serem estes estudos importantes, porém iniciais.

8 CONCLUSÃO

Os resultados do presente trabalho demonstram ser o EHPp eficaz nos principais sintomas que regem a sintomatologia do TEPT. De fato, a resposta de medo referente ao contexto e esquiva, foram atenuadas pelo EHPp, bem como o comportamento tipo-depressivo.

Atualmente há um grande número de estudos que visam a descoberta de novas e mais eficazes abordagens terapêuticas para o TEPT. Tendo sido já mostrado possuir efeitos em outras patologias, o EHPp se mostrou promissor no tratamento da sintomatologia do TEPT, principalmente na forma de tratamento terapêutico, ou seja, administrado logo após a ocorrência do evento traumático.

Os resultados do presente trabalho permitem ampliar os dados encontrados na literatura, referentes aos efeitos da *Polygala paniculata*, no entanto, devido às limitações inerentes aos modelos animais, que não permitem a transposição completa dos sintomas e da complexidade das doenças neuropsiquiátricas, as conclusões sobre seus efeitos e aplicações devem ser feitas com cautela e seguida de experimentos adicionais. Contudo, os efeitos anti-inflamatórios apresentados pelo EHPp indicam sua potencialidade para o tratamento do TEPT e de outras patologias neuropsiquiátricas, relacionadas com a neuroinflamação.

REFERÊNCIAS

AGUIAR, A. C. A.; MARQUES, M. C. M.; YAMAMOTO, K. Taxonomia das espécies de *Polygala* L. subg. *Hebeclada* (Chodat) Blake (*Polygalaceae*) ocorrentes no Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**. 6 (1): 91-109, 2008.

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

ALMEIDA, R. N.; et al. Modelos animais para o estudo de drogas antidepressivas. In. CARLINI, E. A.; MENDES, F. R. **Protocolos de Psicofarmacologia Comportamental**. São Paulo: Editora Fap-Unifesp, 2011.

ANDERO, R.; RESSLER, K. J. Fear extinction and BDNF: Translating animal models of PTSD to the clinic. **Genes Brain Behav.** 11(5): 503–512. 2012.

ANDRADE, S. F.; CARDOSO, L. G.; BASTOS, J. K. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of extract, fractions and populnoic acid from bark wood of *Austroplenckia populnea*. **J. Ethnopharmacol.** 12; 109 (3):464-71, 2007.

ANGELUCCI, F.; et al. BDNF serum levels in subjects developing or not post-traumatic stress disorder after trauma exposure. **Brain Cogn.** 84(1):118-22, 2014.

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

ARAKAWA, S.; et al. Minocycline produced antidepressant-like effects on the learned helplessness rats with alterations in levels of monoamine in the amygdala and no changes in BDNF levels in the hippocampus at baseline. **Pharmacol. Biochem. Behav.** 100(3),601–606, 2012.

ARAÚJO, A. C.; LOTUFO-NETO, F. A Nova Classificação Americana Para os Transtornos Mentais – o DSM-5. **Revista Brasileira de Terapia Comportamental e Cognitiva**. Vol. XVI, no. 1, 67 – 82, 2014.

ARNSTEN, A. F. T.; et al. The effects of stress exposure on prefrontal cortex: Translating basic research into successful treatments for post-traumatic stress disorder. **Neurobiol. Stress.** 1, 89-99, 2015.

BALI, A.; JAGGI, A. S. Electric foot shock stress: a useful tool in neuropsychiatric studies. **Rev. Neurosci.** 26(6): 655–677, 2015.

BARBOSA, I. G. Estudo Da Concentração Plasmática de Fatores Neurotróficos (BDNF, NGF e GDNF) em Pacientes com Transtorno Bipolar do Humor. Dissertação (Mestrado em Neurociências). Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. Minas Gerais. 2009.

BEAR, M. F.; CONNORS, B. W.; PARADISO, M. A. **Neurociências: desvendando o Sistema nervosa.** Porto Alegre. Artmed, 2002.

BEAUREGARD, M.; LEVESQUE, J.; BOURGOUIN, P. Neural correlates of conscious self-regulation of emotion. **J. Neurosci.** 21: RC165, 2001.

BENNETT, M. R.; HATTON, S. N.; LAGOPOULOS, J. Stress, trauma and PTSD: translational insights into the core synaptic circuitry and its modulation. **Brain Struct. Funct.** 221(5):2401-26, 2015.

BETTIO, L. E. B.; et al. Antidepressant-like effect of extract from *Polygala paniculata*: Involvement of the monoaminergic systems. **Pharm Biol.** 49(12): 1277–1285, 2011.

BOERNGEN-LACERDA, R.; SOUZA-FORMIGONI, M. L. Does the increase in locomotion induced by ethanol indicate its stimulant or anxiolytic properties? **Pharmacol. Biochem. Behav.** 67(2):225-32, 2000.

BOISSY, A.; et al. Assessment of positive emotions in animals to improve their welfare. **Physiol. Behav.** (92) 375–397, 2007

BOSCARINO, J. A. Posttraumatic stress disorder and physical illness: results from clinical and epidemiologic studies. **Ann. N.Y. Acad. Sci.** 1032:141–153, 2004.

BOURIN, M. Animal models for screening anxiolytic-like drugs: a perspective. **Dialogues Clin Neurosci.** 17(3):295-303, 2015.

BRAUN, D.; MADRIGAL, J. L. M.; FEINSTEIN, D. L. Noradrenergic Regulation of Glial Activation: Molecular Mechanisms and Therapeutic Implications. **Curr Neuropharmacol.** (12) 342-352, 2014.

BREMNER, J. D. Neuroimaging in posttraumatic stress disorder and other stress-related disorders. **Neuroimaging Clin N Am.** 17(4):523-38, 2007.

BRUEHL, H.; et al. Increased Prefrontal Cortical Thickness Is Associated with Enhanced Abilities to Regulate Emotions in PTSD-Free Women with Borderline Personality Disorder. **PLoS ONE.** 5;8(6), 2007.

BURBIEL, J. C. Primary prevention of posttraumatic stress disorder: drugs and implications. **Mil Med Res.** 26; 2:24, 2015.

BUTLER, G.; et al. Exposure and anxiety management in the treatment of social phobia. **J Consult Clin Psychol.** 52:642-650, 1984.

CAMPOS, O. P. R.; et al. Antinociceptive properties of the hydroalcoholic extract and preliminary study of a xanthone isolated from *Polygala cyparissias* (*Polygalaceae*). **Life. Sci.** v.61, n.16, p.1619-1630, 1997.

CARR, G. D. Disponível em:
http://www.botany.hawaii.edu/faculty/carr/images/pol_pan_fl_cu1.jpg.
Acesso em: 15 abr 2016.

CHEN, J.; et al. Effect of the plant -extract osthole on the relaxation of rabbit corpus cavernosum tissue in vitro. **J Urol.** v. 163, p. 1975-1980, 2000.

CHENG, J. F.; et al. Discovery and structure-activity relationship of coumarin derivatives as TNF- α inhibitors. **Bioorg Med Chem Lett.** v. 14, p.2411-2415, 2004.

CHOI, D. C.; et al. Prelimbic cortical BDNF is required for memory of learned fear but not extinction or innate fear. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**; 107:2675–2680, 2010.

CHUNG, I. W. Behavioural pharmacology of polygalasaponins indicates potential antipsychotic efficacy. **Pharmacol. Biochem. Behav.** 71, n.1-2, 191-195, 2002.

CLARK, S. M. Immune status influences fear and anxiety responses in mice after acute stress exposure. **Brain Behav. Immun.** 192–201, 2014.

CO, L. L. Disponível em:
http://www.phytoimages.siu.edu/imgs/benctan/r/Polygalaceae_Polygala_paniculata_33199.html. Acesso em: 15 abr 2016.

COHEN, H.; et al. Animal model for PTSD: From clinical concept to translational research. **Neuropharmacology.** 62, 715-724, 2012.

COHEN, H.; MATAR, M. A.; ZOHAR, J. Maintaining the Clinical Relevance of Animal Models in Translational Studies of Post-Traumatic Stress Disorder. **ILAR J.** (55) N 2, 2014.

CRISTIANO, R. A Two xanthenes from *Polygala paniculata* and confirmation of the 1-hydroxy-2,3,5-trimethoxy-xanthone at trace level by HRGC-MS. **Z. Naturforsch [C]**, v.58, n.7-8, p. 490-494, 2003.

CUNNINGHAM, C.; SANDERSON, D. J. Malaise in the water maze: untangling the effects of LPS and IL-1beta on learning and memory. **Brain Behav. Immun.** 22, 1117–1127, 2008.

CURINI, M.; et al. Synthesis and anti-inflammatory activity of natural and semisynthetic geranyloxycouamrins. **Bioorg Med Chem Lett.** v. 14, p. 2241-2243, 2004.

DALAI-LAMA. **Palavras de Sabedoria/ Sua Santidade o Dalai-Lama.** Compilado e editado por Renuka Singh; tradução de Maria Cláudia Alves – Rio de Janeiro: Sextante, 2001.

DANTZER, R. Cytokine-induced sickness behavior: mechanisms and implications. **Ann. N. Y. Acad. Sci.** 933, 222–234, 2001.

DANTZER; R. Cytokine, Sickness Behavior, and Depression. **Immunol. Allergy. Clin. North Am.** 29(2): 247–264, 2009.

DANTZER, R.; et al. From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain. **Na. Rev. Neurosci.** 9(1): 46–56, 2008.

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

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

DASKALAKIS, N. P.; YEHUDA, R. PTSD in the Military: Prevalence, Pathophysiology, Treatment. Principles for developing animal models of military PTSD. **Eur J Psychotraumatol**. 5: 23825, 2014.

DEFENSOR, E. B.; et al. Facial expressions of mice in aggressive and fearful contexts. **Physiol Behav**. 107, 680–685, 2012.

DÉGEILH, et al. 2013. Disponível em: http://www.adaa.org/sites/default/files/Larson_317.pdf. Acesso em: 21 mar 2016.

DEJEAN, C.; et al. (2015). Neuronal circuits for fear expression and recovery: recent advances and potential therapeutic strategies. **Biol. Psychiatry** 78, 298–306, 2015.

DELL'OSSO, L.; et al. Brain-derived neurotrophic factor plasma levels in patients suffering from post-traumatic stress disorder. **Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry** 33 899–902, 2009.

DEPPERMAN, S. et al. Stress-Induced Neuroplasticity: (Mal) Adaptation To Adverse Life Events in Patients With PTSD – A Critical Overview. **Neuroscience**. 283 166–177, 2014.

DÉSIRÉ, L.; BOISSY, A.; VEISSIER, I. Emotions in farm animals: a new approach to animal welfare in applied ethology. **Behav. Process**. 60, 165–180, 2002.

DESMEDT, A.; MARIGHETTO, A.; PIAZZA, P.V. Abnormal fear memory as a model for posttraumatic stress disorder. **Biol Psychiatry**. 78:290–297, 2015.

DINIZ, B. S.; et al. Circulating glial-derived neurotrophic factor is reduced in late-life depression. **J. Psychiatr.** 46, 135–139, 2012.

DIOGO, R.; et al. On the origin, homologies and evolution of primate facial muscles, with a particular focus on hominoids and a suggested unifying nomenclature for the facial muscles of the Mammalia. **J.Anat.** 215, 300–319, 2009.

DSM-IV- Manual diagnóstico e estatístico de transtornos mentais. trad. Cláudia Dornelles; – 4.ed. rev. – Porto Alegre: Artmed, 2002.

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

EL SAYAH, M.; et al. In vitro effect of the extract and the 1,7-dihydroxy-2,3-dimethoxy xanthone from *Polygala cyparissias* on the contractions induced by inflammatory mediators and ovalbumin in normal and actively sensitised trachea from guinea pig. **Inflamm. Res.** n.4, p.218-223, 1999.

ETKIN, A. Functional neuroanatomy of anxiety: a neural circuit perspective. **Curr. Top. Behav. Neurosci.** 2:251–77, 2010.

FAGG, B. M. Disponível em:
<http://www.cpbr.gov.au/photo/apii/id/dig/19877>. Acesso em: 15 abr 2016.

FARIAS, F. R. Sobre o conceito de estresse. **Arq. bras. Psic.**, Rio de Janeiro, 38(4): 97-105, out./dez. 1985.

FARINA, M.; et al. Protective effects of *Polygala paniculata* extract against methylmercury-induced neurotoxicity in mice. **J. Pharm. Pharmacol.**, v.57, p.1-6, 2005.

FIGUEIRA, I.; MENDLOWIC, Z. B. M. Diagnóstico do transtorno de estresse pós-traumático. **Ver. Bras. Psiquiatr.**;25(Supl I):12-6, 2003.

FIRMO, W. C. A.; et al. Contexto Histórico, Uso Popular e Concepção Científica Sobre Plantas Medicinais. **Cad. Pesq. São Luís**, v. 18, n. especial, dez. 2011.

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. **Sobre o mecanismo psíquico dos fenômenos histéricos: Comunicação preliminar**. Obras Completas II. Imago, 1972.

GADEK-MICHALSKA, A.; et al. Cytokines, prostaglandins and nitric oxide in the regulation of stress-response systems. **Pharmacol Rep.** 65, 1655-1662, 2013.

GARCÍA-BUENO, B.; CASO, J. R.; LEZA, J. C. Stress as a neuroinflammatory condition in brain: damaging and protective mechanisms. **Neurosci. Biobehav. Rev.** 32, 1136–1151, 2008.

GARRIDO-MESA, N.; ZARZUELO, A.; GÁLVEZ, J. What is behind the non-antibiotic propertie of minocycline? **Pharmacol.** 67 (1), 18–30, 2013.

GIRALDI, M.; HANAZAKI, N. Uso e conhecimento tradicional de plantas medicinais no Sertão do Ribeirão, Florianópolis, SC, Brasil. **Acta bot. bras.** 24(2): 395-406, 2010.

GRAH, M. Brain-derived neurotrophic factor as a suicide factor in mental disorders. **Acta Neuropsychiatr.** 26(6):356-63, 2014.

GRANDIN, T.; DEESING, M. J. Genetics and the Behavior of Domestic Animals. Elsevier Inc. Amsterdam, pp. 1–485, 2013.

GRANHOLM, A. C.; et al. Glial cell line-derived neurotrophic factor is essential for postnatal survival of midbrain dopamine neurons. **J. Neurosci.** 20: 3182–3190, 2000.

GEORGE, S. A.; et al. Alterations in cognitive flexibility in a rat model of post-traumatic stress disorder. **Behav. Brain. Res.** 1; 286: 256-64, 2015.

GIUSTINO, T. F.; MAREN, S. The Role of the Medial Prefrontal Cortex in the Conditioning and Extinction of Fear. **Front Behav Neurosci.** 9; 9: 298, 2015.

GNERRE, C.; et al. Natural and synthetic xanthenes as monoamine oxidase inhibitors: biological assay and 3D-DSAR. **Helv Chim Acta.** v.84, 552-570, 2001.

GOLA, H.; et al. Posttraumatic stress disorder is associated with an enhanced pontaneous production of pro-inflammatory cytokines by peripheral blood mononuclear cells. **BMC Psychiatry.** 29;13:40, 2013.

GOSHEN, I.; et al. A dual role for interleukin-1 in hippocampal-dependent memory processes. **Psychoneuroendocrinology.** 32(8-10):1106-15, 2007.

GOSHEN, I.; et al. Brain interleukin-1 mediates chronic stress-induced depression in mice via adrenocortical activation and hippocampal neurogenesis suppression. **Mol. Psychiatry.** 13, 717–728, 2008.

GOSHEN, I.; YIRMIYA, R. Interleukin-1b: a central regulator of stress responses. **Front. Neuroendocrinol.** 30, 30–45, 2009.

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.

GRIFFIN, G. D.; CHARRON, D.; AL-DACCAK, R. Post-traumatic stress disorder: revisiting adrenergics, glucocorticoids, immune system effects and homeostasis. **Clin Transl Immunology.** 14;3(11): e 27, 2014.

GUARDIA, T.; et al. Anti-inflammatory properties os plant flavonoids. Effect of rutin, quercetin and hiperidin on adjuvant arthritis in rat. **II Pharmacology**, v. 56, p. 683-687, 2001.

HAMBURGER, M.; GUPTA, M.; HOSTETTMANN, K. Coumarins from *Polygala paniculata*. **Planta Med.** (3):215-7, 1985.

HAUCK, S.; et al. Serum brain-derived neurotrophic factor in patients with trauma psychopathology. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**. 34 459–462, 2010.

HAYES, J. P. Reduced hippocampal and amygdala activity predicts memory distortions for trauma reminders in combat-related PTSD. **J. Psychiatr. Res.** 45(5): 660–669, 2011.

HERRY, C.; et al. Neuronal circuits of fear extinction. **Eur. J. Neurosci.** 31, 599–612, 2010.

HOEFFEL, J. L. M. Conhecimento Tradicional e Uso de Plantas Medicinais nas Apas's Cantareira/Sp e Fernão Dias/Mg. **Revista VITAS – Visões Transdisciplinares sobre Ambiente e Sociedade**. Nº 1, set, 2011.

HOSKINS, M.; et al. Pharmacotherapy for post-traumatic stress disorder: systematic review and meta-analysis. **Br. J. Psychiatry**. 206 (2): 93-100, 2015.

HOULT, J.R.S.; PAYÁ, M. Pharmacological and Biochemical Actions of Simple Coumarins: Natural Products with Therapeutic Potential. **General Pharmacology**. v. 27, n. 4, p. 713-722, 1996

HUGHES, K. C.; SHIN, L. M. Functional neuroimaging studies of post-traumatic stress disorder. **Expert. Rev. Neurother.** 11: 275–285, 2011.

IBÁÑEZ, C. F.; ANDRESSOO, J. O. Biology of GDNF and its receptors - Relevance for disorders of the central nervous system. **Neurobiol Dis.** 2016.

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

JEON, S. W.; KIM, Y-K. Molecular Neurobiology and Promising New Treatment in Depression. **Int. J. Mol. Sci.** 17, 381, 2016.

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

JONES, M. E.; et al. The Role of Brain Interleukin-1 in Stress-Enhanced Fear Learning. **Neuropsychopharmacology**. 40, 1289–1296, 2015.

KALISCH, R.; et al. Context-dependent human extinction memory is mediated by a ventromedial prefrontal and hippocampal network. **J. Neurosci**. 13;26 (37):9503-11, 2006.

KALUEFF, A.V.; et al. Neurobiology of rodent self-grooming and its value for translational neuroscience. **Nat. Rev. Neuroscience**. 17(1):45-59, 2016.

KAO, C-Y.; et al. Fluoxetine treatment prevents the inflammatory response in a mouse model of posttraumatic stress disorder. **J Psychiatr Res**. 76. 74e83, 2016.

KASTER, M. P.; et al. Depressive-like behavior induced by tumor necrosis factor- α in mice. **Neuropharmacology**. 62(1):419-26, 2012.

KESSLER, R. C.; GREENBERG, P. E. The Economic Burden of Anxiety and Stress Disorders. In **Neuropsychopharmacology: The Fifth Generation of Progress**. Edited by Kenneth L. Davis, Dennis Charney, Joseph T. Coyle, and Charles Nemeroff. American College of Neuropsychopharmacology, 2002.

KHAIROVA, R. A.; et al. A potential role for pro inflammatory cytokines in regulating synaptic plasticity in major depressive disorder. **Int J Neuropsychopharmacol**. 12, 561–578, 2009.

KILLGORE, W. D. S.; et al. Cortico-Limbic Responses to Masked Affective Faces Across PTSD, Panic Disorder, and Specific phobia. **Depress Anxiety**. 31(2): 150–159, 2014.

KIM, H.-S.; SUH, Y.-H. Minocycline and neurodegenerative diseases. **Behav. Brain Res**. 196(2),168–179, 2009.

KNAPP, P.; BECK, A. T. Fundamentos, modelos conceituais, aplicações e pesquisa da terapia cognitiva. **Ver. Bras. Psiquiatr**. 30(Supl II): S54-64, 2008.

KOBAYASHI, T. M.; PATEL, M.; LOTITO, M. Pharmacotherapy for posttraumatic stress disorder at a Veterans Affairs facility. **Am. J. Health-Syst Pharm.** 1, Suppl 1, 2015.

KOEK, R. J.; et al. Treatment-refractory posttraumatic stress disorder (TRPTSD): a review and framework for the future. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.** 6, 2016.

KOENEN, K. C. et al. Persisting posttraumatic stress disorder symptoms and their relationship to functioning in Vietnam veterans: a 14-year follow-up. **J. Trauma. Stress** 21, 49–57, 2008.

KOTYUK, E.; et al. Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor (GDNF) as a Novel Candidate Gene of Anxiety. **PLoS ONE.** 8(12): e80613, 2013.

KOU, J.; et al. Blood-activating and anti-inflammatory actions of *Polygala fallax*. **Zhong Yao Cai.** v.26, n.4, p. 268-71, 2003.

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

LAPA, F. R. Avaliação da Atividade Antinociceptiva, Antiinflamatória e Protetora Gástrica do Extrato Hidroalcoólico Bruto da *Polygala paniculata L.* Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. Departamento de Farmacologia. Universidade Federal do Paraná. Paraná, 2006.

LAPA, F. R. et al. Gastroprotective activity of the hydroalcoholic extract obtained from *Polygala paniculata L.* in rats. **J Pharm Pharmacol.** 59: 1413–1419, 2007.

LAPA, R. F. et al. Antinociceptive Properties of the Hydroalcoholic Extract and the Flavonoid Rutin Obtained from *Polygala paniculata L.* in Mice. **Basic Clin Pharmacol Toxicol.** 104, 306–315, 2009.

LAPA, F. R. et al. Vasorelaxant and hypotensive effects of the extract and the isolated flavonoid rutin obtained from *Polygala paniculata L.* **JPP.** 63: 875–881, 2011.

- LECORPS, B., FÉRON, C. Correlates between ear postures and emotional reactivity in a wild type mouse species. **Behav Processes.** 120 25–29, 2015.
- LEE, H.; NOH, J. Pair exposure with conspecific during fear conditioning induces the link between freezing and passive avoidance behaviors in rats. **Neurosci Res.** 2016.
- LEVKOVITZ, Y.; et al. Minocycline a second-generation tetracycline, as a neuroprotective agent in an animal model of schizophrenia. **Brain Res.** 1154,154–162, 2007.
- LEVKOVITZ, Y.; et al. Early post-stressor intervention with minocycline, a second-generation tetracycline, attenuates post-traumatic stress response in an animal model of PTSD. **Eur Neuropsychopharmacol.** 25, 124–132, 2015.
- LI, Z.; et al. Effects of unconditioned and conditioned aversive stimuli in an intense fear conditioning paradigm on synaptic plasticity in the hippocampal CA1 area in vivo. **Hippocampus.** 15, 815–824, 2005.
- LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. *Plantas Medicinais do Brasil.* São Paulo, Brazil. p. 386, 2002.
- LORZ, C.; MEHMET, H. The role of death receptors in neural injury. **Front. Biosci.** 1;14:583-95, 2009.
- LÜDTKE, R.; SOUZA-CHIES, T. T.; MIOTTO, S. T. S. O gênero *Polygala* L. (Polygalaceae) na região Sul do Brasil. **Hoehnea.** 40(1): 1-50, 2013.
- MAREK, R.; et al. The amygdala and medial prefrontal cortex: partners in the fear circuit. **J. Physiol.** 591(10):2381-2391, 2013.
- MAREN, S.; QUIRK, G. J. Neuronal signalling of fear memory. **Nat. Rev. Neurosci.** 5, 844–852, 2004.
- MARTINOTTI, G.; et al. BDNF concentration and impulsiveness level in post-traumatic stress disorder. **Psychiatry Research.** 229, 814–818, 2015.

MARTINS-SILVA, C.; et al. Novel strains of mice deficient for the vesicular acetylcholine transporter: insights on transcriptional regulation and control of locomotor behavior. **PLoS One**, v. 6, n. 3, 2011.

MATAR, M. A.; ZOHAR, J.; COHEN, H. Translationally relevant modeling of PTSD in rodents. **Cell Tissue Res**. 354:127–139, 2013.

MATSUOKA, Y. et al. Serum pro-BDNF/BDNF as a treatment biomarker for response to docosahexaenoic acid in traumatized people vulnerable to developing psychological distress: a randomized controlled trial. **Transl. Psychiatry**. 5, e596, 2015.

MCLAUGHLIN, R. J.; HILL, M. N.; GORZALKA, B. B. A critical role for prefrontocortical endocannabinoid signaling in the regulation of stress and emotional behavior. **Neurosci. Biobehav. Rev.** 42C:116–131, 2014.

MENEZES, J.; et al. Facilitation of fear extinction by novelty depends on dopamine acting on D1-subtype dopamine receptors in hippocampus. **PNAS**. 2015.

MIDDLETON, E. J. R.; KANDASWAM, C.; THEOHARIDES, T. C. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease and cancer. **Pharmacological Reviews**, v. 53, p. 673-751, 2000.

MILAD, M. R.; et al. Recall of fear extinction in humans activates the ventromedial prefrontal cortex and hippocampus in concert. **Biol. Psychiatry**. 62:446–454, 2007.

MILLER, A. H.; MALETIC, V.; RAISON, C. L. Inflammation and its discontents: the role of cytokines in the pathophysiology of major depression. **Biol. Psychiatry**. 65, 732–741, 2009.

MOLINA-HERNÁNDEZ, M.; et al. Antidepressant-like actions of minocycline combined with several glutamate antagonists. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**. 32(2),380–386, 2008.

MOORE, A. H.; et al. Sustained expression of interleukin-1beta in mouse hippocampus impairs spatial memory. **Neuroscience**. 164, 1484–1495, 2009.

MORAES, Renato Couto. Papel da corticosterona na vigência do estresse sobre a função da pineal em ratos. Tese (Doutorado). Universidade de São Paulo. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. Instituto de Ciências Biomédicas. São Paulo, 2010.

MORRIS, M. C.; COMPAS, B. E.; GARBER, J. Relations among Posttraumatic Stress Disorder, Comorbid Major Depression, and HPA Function: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Clin. Psychol. Rev.** 32(4): 301–315, 2012.

MORRISON, F. G.; RESSLER, K. J. From the Neurobiology of extinction to Improved Clinical Treatments. **Depress. Anxiety**. 31(4): 279–290, 2014.

MUKAMAL, R. C.; MOREIRA, V. G.; CARRASCO, F. M. Neurobiologia da Memória. In. **Neurociências: diálogos e interseções**. ANTONIO, V. E. Rio de Janeiro. Rubio, 2012.

MYSKIW, J. C.; IZQUIERDO, I.; FURINI, C. R. G. Modulation of the extinction of fear learning. **Brain Res Bull**. 105 61–69, 2014.

NAJAVITS, L. M. The problem of dropout from “gold standard” PTSD therapies. **F1000Prime Reports**. 7:43, 2015.

NASSIRI-ALS, M.; SHARIATI-RAD, S.; ZAMANSOLTAN, F. Anticonvulsive effects of intracerebroventricular administration of rutin in rats. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**. v. 32, p. 989–993, 2008.

NEIGH, G. N.; et al. Anxiety after cardiac arrest/cardiopulmonary resuscitation: exacerbated by stress and prevented by minocycline. **Stroke** 40. (11), 3601–3607, 2009.

NEWALL, A. C.; et al. Herbal medicines: a guide for health-care professionals. **Pharmaceutical Press**. London, p. 241, 1996.

- NITTA A.; et al. Hydrophobic dipeptide Leu-Ile protects against neuronal death by inducing brain-derived neurotrophic factor and glial cell line-derived neurotrophic factor synthesis. **J. Neurosci. Res.** 78: 250–258, 2004.
- O'CONNOR, J. C.; et al. Lipopolysaccharide-induced depressive-like behavior is mediated by indoleamine 2,3-dioxygenase activation in mice. **Mol. Psychiatry.** (5):511-22, 2009.
- O'DONOVAN, A.; et al. Clinical anxiety, cortisol and interleukin-6: Evidence for specificity in emotion–biology relationships. **Brain Behav Immun.** 24 1074–1077, 2010.
- OLFF, M.; et al. Changes in cortisol and DHEA plasma levels after psychotherapy for PTSD. **Psychoneuroendocrinology.** 32(6):619-26, 2007.
- PABLOS, R. M.; et al. Stress Increases Vulnerability to Inflammation in the Rat Prefrontal Cortex. **J Neurosci.** 26(21): 5709-5719, 2006.
- 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.
- PALIN, K. Tumor necrosis factor- α -induced sickness behavior is impaired by central administration of an inhibitor of c-jun N-terminal kinase. **Psychopharmacology** (Berl). 197(4): 629–635, 2008.
- PANDEY, G. N.; et al. Proinflammatory Cytokines in the Prefrontal Cortex of Teenage Suicide Victims. **J. Psychiatr. Res.** 46(1): 57–63, 2012.
- PANG, E. W.; et al. Colour or shape: examination of neural processes underlying mental flexibility in posttraumatic stress disorder. **Transl. Psychiatry.** 4, e 421, 2014.
- PARNET, P.; et al. Expression and regulation of interleukin-1 receptors in the brain. Role in cytokines-induced sickness behavior. **J. Neuroimmunol.** 125, 5–14, 2002.

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.

PEDRIALI, C. A. Síntese química de derivados hidrossolúveis da rutina: determinação de suas propriedades físico-químicas e avaliação de suas atividades antioxidantes. 2005. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Departamento de Tecnologia Bioquímica-Farmacêutica. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

PILLA, M. A. C.; AMOROZO, M. C.; FURLAN, A. Obtenção e uso das plantas medicinais no distrito de Martim Francisco, município de Mogi-Mirim, SP, Brasil. **Acta Botanica Brasilica** 20(4): 789-802. 2006.

PINEL, J. P. J. **Biopsicologia**; trad. Ronaldo Cataldo Costa. – 5.ed. – Porto Alegre: Artmed, P.451, 2005.

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.

PITMAN, R. K.; et al. Biological studies of post-traumatic stress disorder. **Nat. Rev. Neurosci.** 13, 769–787, 2012.

PIZZOLATTI, M. G. Trypanocidal activity of extracts from brazilian atlantic rain forest plant species. **Phytomedicine.** 10, n.5, p.422-426, 2003.

QUIRK, G. J.; et al. The role of ventromedial prefrontal cortex in the recovery of extinguished fear. **J. Neurosci.** 20:6225–6231, 2000.

QUIRK, G. J.; MUELLER, D. Neural mechanisms of extinction learning and retrieval. **Neuropsychopharmacology.** 33, 56-72, 2008.

RAUCH, S. L.; et al. Neuroimaging and the neuroanatomy of PTSD. **CNS Spectrums** 3. Suppl.2, 30–41, 1998.

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

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

REMUS, J. L.; DANTZER, R. Inflammation models of depression in rodents: relevance to psychotropic drug discovery. **Int J Neuropsychopharmacol**. 1-13, 2016.

REZNIKOV, R.; et al. Towards a better preclinical model of PTSD: Characterizing animals with weak extinction, maladaptive stress responses and low plasma corticosterone. **J Psychiatr Res**. 61 158-165, 2015.

RODRIGUES, E.; OTSUKA, R. D. Estratégias utilizadas para a seleção de plantas com potencial bioativo com ênfase no métodos da Etnobotânica e Etnofarmacologia. In. CARLINI, E. A.; MENDES, F. R. **Protocolos de Psicofarmacologia Comportamental**. São Paulo: Editora Fap-Unifesp, 2011.

ROELING, T. A.; et al. Efferent connections of the hypothalamic “grooming area” in the rat. **Neuroscience**. 56, 199–225, 1993.

ROSA, A. R.; et al. Increased serum glial cell line-derived neurotrophic factor immunoreactive during manic and depressive episodes in individuals with bipolar disorder. **Neurosci. Lett**. 407: 146–150, 2006.

RUIZ, J. E.; et al. Psiconeuroendocrinologia do transtorno de estresse pós-traumático. **Ver. Bras. Psiquiatr**. 29 (Supl I):S7-12, 2007.

RYTWINSKI, N. K.; et al. Are PTSD Treatment Choices and Treatment Beliefs Related to Depression Symptoms and Depression-Relevant Treatment Rationales? **Behav. Res. Ther**. 61: 96–104, 2014.

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

SANTOS, L. C.; et al. Atividade antioxidante de xantonas isoladas de

espécies de *Leiothrix* (Eriocaulaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**. V. 13, n. 2, 67-74, 2003.

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

SCHESTATSKY, S.; et al. A evolução histórica do conceito de estresse pós-traumático. **Ver. Bras. Psiquiatr.** 25(Supl I):8-11, 2003.

SCHWEIZER, S.; DALGLEISH, T. Emotional working memory capacity in posttraumatic stress disorder (PTSD). **Behav Res Ther.** 49 498-504, 2011.

SHALEV, A. Y. Stress hormones and post-traumatic stress disorder in civilian trauma victims: a longitudinal study. Part I: HPA axis responses. **Int J Neuropsychopharmacol.** 11, 365–372, 2008.

SHANSKY, R. M. Sex differences in PTSD resilience and susceptibility: Challenges for animal models of fear learning. **Neurobiol. Stress.** 1: 60–65, 2015.

SHERIN, J. E.; NEMEROFF, C. B. Post-traumatic stress disorder: the neurobiological impact of psychological trauma. **Dialogues Clin. Neurosci.** 13(3):263–278, 2011.

SINGEWALD, N.; et al. Pharmacology of cognitive enhancers for exposure-based therapy of fear, anxiety and trauma-related disorders. **Pharmacol Ther.** 149 150–190, 2015.

SINGH, V.; et al. Coumarin Congeners as Antidepressants. *Arzneim.-Forsch./Drug Res.* V. 42, n. 8, p. 993-998, 1992.

SITGES, M.; GOMEZ, C. D.; ALDANA, B. I. Sertraline Reduces IL-1b and TNF-a RNAm Expression and Overcomes Their Rise Induced by Seizures in the Rat Hippocampus. **PLoS ONE.** 9(11), 2014.

SOARES, B. G. O.; LIMA, M. S. Manejo do TEPT baseado em evidências. **Ver. Bras. Psiquiatr.** 25(Supl I):62-6, 2003.

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.

SOFUOGLU, M.; ROSENHECK, R.; PETRAKIS, I. Pharmacological treatment of comorbid PTSD and substance use disorder: recent progress. **Addict Behav.** 39 (2):428-33, 2014.

STEPANICHEV, M.; et al. Rodent Models of Depression: Neurotrophic and Neuroinflammatory Biomarkers. **Biomed Res Int.** 2014.

SU, S.; et al. Plasma brain-derived neurotrophic factor levels in patients suffering from post-traumatic stress disorder. **Psychiatry Res.** 229 365–369, 2015.

THOMSON, C.; BLOCH, A.; HASLER, C. M., Position of the American Dietetic Association, Orlando, v. 99, n. 10, p. 1280-1281, 1999.

THOMPSON, R. R. J.; et al. Routine handling methods affect behaviour of three-spined sticklebacks in a novel test of anxiety. **Behav Brain Res.** 306 26–35, 2016.

THULL, U.; et al. Substituted xanthenes as selective and reversible monoamine oxidase A inhibitors. **Pharm Res.** v.10, n.8, p.1187-1190, 1993.

TSENG, P.T.; LEE, Y.; LIN, P.Y. Age-associated decrease in serum glial cell line-derived neurotrophic factor levels in patients with major depressive disorder. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.** 40: 334–339, 2013.

UBHI, K.; et al. Fluoxetine ameliorates behavioral and neuropathological deficits in a transgenic model mouse of α -synucleinopathy. **Exp. Neurol.** 234, 405–416. 2012.

VALENTE, N. L. M.; et al. Evolucionismo e genética do transtorno de estresse pós-traumático. **Ver. Psiquiatr. RS.** 30(1 Supl), 2008.

VIVIANI, D.; et al. Sex comparison on long-lasting behavioral and physiological disturbances induced by single shock experience in rats. **Physiol Behav.** 107 243–251, 2012.

von KANEL, R.; et al: Evidence for low-grade systemic pro inflammatory activity in patients with posttraumatic stress disorder. **J. Psychiatr. Res.** 41:744–752, 2007.

WAISELFISZ, J. J. **Mapa da Violência 2010. Anatomia dos Homicídios no Brasil.** Instituto Sangari.

WALKER, K. A.; et al. Neuroinflammation and Comorbidity of Pain and Depression. **Pharmacol Rev.** 66:80–101, 2014.

WANG, P. S.; et al. Failure and delay in initial treatment contact after first onset of mental disorder in the National Comorbidity Survey Replication. **Arch Gen Psychiatry.** 62:603–613. 2005.

WANG, X.; et al. Association study between plasma GDNF and cognitive function in late-onset depression. **J. Affect. Disord.** 132: 418–421, 2011.

WESOLOWSKA, A. Potential role of the 5-HT6 receptor in depression and anxiety: an overview of preclinical. **Pharmacol Rep.** v.62. p.564–577, 2010.

WIECK, A.; et al. Neuroimmunoendocrine Interactions in Post-Traumatic Stress Disorder: Focus on Long-Term Implications of Childhood Maltreatment. **Neuroimmunomodulation.** 21:145–151, 2014.

WILSON, C. B.; et al. Differential effects of sertraline in a predator exposure animal model of post-traumatic stress disorder. **Front Behav Neurosci.** 30;8:256, 2014.

YEH, F-C; KAO, C-F; KUO, P-H. Explore the Features of Brain-Derived Neurotrophic Factor in Mood Disorders. **PLoS ONE.** 10(6), 2015.

YONG, V. W.; et al. The promise of minocycline in neurology. **Lancet Neurol.** 3(12), 744–751, 2004.

YU, H.; CHEN, Z-Y. The role of BDNF in depression on the basis of its location in the neural circuitry. **Acta Pharmacol Sin.** 32(1):3-11, 2011.

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

ZHANG, LEI.; LI, X-X.; HU, X-Z. Post-traumatic stress disorder risk and brain-derived neurotrophic factor Val66Met. **World J Psychiatr.** 6(1): 1-6, 2016.