

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA

DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

CURSO DE GRADUAÇÃO EM FISIOTERAPIA

**ÁCIDO ROSMARÍNICO INIBE A RESPOSTA NEUROINFLAMATÓRIA
AUTOIMUNE E COMPORTAMENTO TIPO DEPRESSIVO EM
CAMUNDONGOS¹**

LARISSA DA ROCHA LAURINDO

ARARANGUÁ

2017

¹Projeto de inovação e desenvolvimento tecnológico com perspectiva de pedido de patente de inovação, de acordo com as diretrizes estabelecidas na Lei nº 13.243 de 11 de janeiro de 2016. Para os devidos efeitos serão consideradas **Informações Confidenciais** todas e quaisquer ideias, estratégias, dados, relatórios, resultados preliminares, dentre outras, as quais não poderão ser repassadas a terceiros do seu conteúdo ou existência.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
CURSO DE GRADUAÇÃO EM FISIOTERAPIA

**ÁCIDO ROSMARÍNICO INIBE A RESPOSTA NEUROINFLAMATÓRIA
AUTOIMUNE E COMPORTAMENTO TIPO DEPRESSIVO EM
CAMUNDONGOS**

LARISSA DA ROCHA LAURINDO

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado à disciplina TCC II do Curso de Fisioterapia da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Fisioterapia.

Orientador: Prof. Dr. Rafael Cypriano Dutra

ARARANGUÁ

2017

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, por ter me dado o dom da vida e iluminado sempre minhas escolhas.

Agradeço também aos meus pais, Braz Z. Laurindo e Rosinete G. da Rocha Laurindo, os quais não mediram esforços pra me oportunizar a possibilidade de estar realizando esse trabalho. Agradeço em especial o meu pai, que todos os dias acordou mais cedo para poder me trazer até a faculdade. Agradeço a minha mãe, por todos os colos que sempre me deu quando eu precisava.

Agradeço meu irmão, Michel da R. Laurindo, por sempre ter paciência e me ajudar no que fosse preciso.

Agradeço minhas amigas que sempre tiveram comigo, me apoiando e me incentivando. Em especial a Bruna Orige, Tamyles, Karol, Grazi, Juliana e Bruna C., que sempre me ouviram e entenderam minha ausência em vários momentos.

Agradeço ao meu orientador Rafael Cypriano Dutra, por ter me aberto à porta para a área da pesquisa, por sempre me orientar quando eu precisava, por ter tido paciência e por dividir parte do seu conhecimento comigo.

Por fim, não poderia deixar de agradecer a toda à família LAIF, que foram de extrema importância em todos os momentos de execução desse trabalho.

*“Cada segundo é tempo para mudar
tudo para sempre”*

(Charles Chaplin)

RESUMO

A Esclerose Múltipla (EM) é uma doença autoimune, inflamatória, crônica e desmielinizante do sistema nervoso central (SNC) – caracterizada pelo desenvolvimento de comprometimento motor, sensorial e visual, além de disfunções intestinais, urinárias, sexuais, déficits cognitivos e particularmente sintomas depressivos. Além disso, a depressão é o principal e mais prevalente transtorno de humor da sociedade atual, representando assim, importante problema de saúde pública. Pacientes que desenvolvem doenças, nas quais há neuroinflamação, tendem a desenvolver sintomas depressivos. A depressão é uma das dez principais causas de morbidade e mortalidade em todo o mundo. Atualmente, as terapias farmacológicas disponíveis para o tratamento da EM e depressão apresentam diferentes efeitos adversos ao organismo, além de possuírem elevado custo e, frequentemente, eficácia clínica limitada. Por esta razão, a busca por novas terapias neuroprotetoras e imunomoduladoras torna-se de fundamental importância para o controle dessas patologias neuropsiquiátricas. Assim, a principal motivação desse trabalho foi investigar os efeitos neuroprotetor e antidepressivo do ácido rosmarínico (AR) (O-cafeoil-3,4-diidroxifenil láctico) em modelos experimentais. No estudo foram utilizados 40 camundongos *Swiss* machos – para avaliar o efeito do AR no comportamento tipo-depressivo, através dos testes de suspensão pela cauda, *splash test* e campo aberto – além de 18 camundongos C57BL6, fêmeas, para avaliar o efeito neuroprotetor do AR no modelo de encefalomielite autoimune experimental, através das avaliações do escore diário e do peso corporal. Resumidamente, os resultados obtidos demonstram o efeito pré-clínico neuroprotetor e antidepressivo do AR.

Palavras chaves: esclerose múltipla; encefalomielite autoimune experimental; depressão; ácido rosmarínico.

ABSTRACT

Multiple sclerosis (MS) is an autoimmune, inflammatory, chronic and demyelinating disease of the central nervous system (CNS) characterized by the development of motor, sensory and visual impairment, as well as intestinal, urinary, sexual dysfunction, cognitive deficits and depression. Depression is the main and most prevalent mood disorder in today's society, thus representing an important public health problem. Patients who develop diseases, in which there is neuroinflammation, tend to develop depressive symptoms. In addition, depression is one of the top ten causes of morbidity and mortality worldwide. Currently, pharmacological therapies available for the treatment of MS and depression have different adverse effects on the body, and are costly and often of limited clinical efficacy. For this reason, the search for new neuroprotective and immunomodulatory therapies becomes of fundamental importance for the control of these neuropsychiatric disorders. Thus, the main motivation of this work was to investigate the neuroprotective and antidepressant effects of rosmarinic acid -O-caffeoyl-3,4-dihydroxyphenyl lactic acid. The sample consisted of 40 male Swiss mice, which were used to evaluate the effect of rosmarinic acid on the type-depressive behavior, through the tests of tail suspension, splash test and open field. In addition, 18 female C57BL6 mice were used to evaluate the neuroprotective effect of rosmarinic acid on the experimental autoimmune encephalomyelitis model through daily score and body weight assessments. Briefly, the results demonstrate the neuroprotective and antidepressant preclinical effect of rosmarinic acid.

Key words: Multiple sclerosis; experimental autoimmune encephalomyelitis; depression; rosmarinic acid.

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Localização da lesão correspondente aos sinais e sintomas decorrentes nos pacientes com EM.....	13
Quadro 2. Avaliação clínica dos animais durante o decurso da encefalomielite autoimune experimental, relacionada ao escore dos sinais clínicos associados ao desenvolvimento da encefalomielite autoimune experimental.....	15

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Estrutura química do AR	27
Figura 2. Teste de suspensão pela cauda (TSC).....	34
Figura 3. Teste do campo aberto (TCA).....	35
Figura 4. Fases do movimento de <i>grooming</i> avaliadas no <i>Splash test</i>	36
Figura 5. Tratamento preventivo com AR reduziu o surgimento dos sinais clínicos e a perda de peso induzidos pela EAE.	38
Figura 6. Tratamento terapêutico com AR reduziu o surgimento dos sinais clínicos e a perda de peso induzidos pela EAE.	39
Figura 7. Tratamento agudo com AR previniu o comportamento tipo-depressivo induzido por LPS	41
Figura 8. Tratamento agudo com AR não prejudicou o comportamento locomotor e exploratório dos animais.	42
Figura 9. Tratamento repetido com AR previniu o comportamento tipo-depressivo induzido por LPS.	42
Figura 10. Tratamento repetido com AR não prejudicou o comportamento locomotor e exploratório dos animais.	43

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-HT	Serotonina
6- OHDA	6- hidroxidopamina
ACTH	Hormônio adrenocorticotrópico
Ag	Antígenos
AMPC	Adenosina-monofosfato-cíclico
APC's	Células apresentadoras de antígenos
AR	Ácido Rosmarínico
AVP	Vasopressina
BDNF	Fator neurotrófico derivado do cérebro
BHE	Barreira hemato-encefálica
C57BL/6	Linhagem de camundongos isogênicos <i>black</i>
CD's	Células dendríticas
CFA	Adjuvante completo de <i>Freund</i>
CRF	Hormônio adrenocorticotrópico
DA	Dopamina
DA	Doença de Alzheimer
DP	Doença de Parkinson
DTNB	Ácido 5,5 '-ditio-bis-2-nitrobenzóico
EAE	Encefalomielite autoimune experimental
EBV	<i>Epstein Barr</i> vírus
EM	Esclerose múltipla
ERK	Quinase regulada pela sinalização extracelular
GPX	Enzima glutationaperoxidase
GSH	Glutathiona
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HHV-6	<i>Herpes</i> Vírus tipo 6

HLA	Antígeno leucocitário humano
HLC	Hormônio liberador de corticotropina
HPA	Eixo hipotálamo- pituitária- adrenal
IFN	Interferon
i.p.	Intra Plantar
IL	Interleucina
iNOS	Óxido nítrico sintase induzida
LB	Linfócitos B
LCE	Labirinto em cruz elevado
LFA-1	Anticorpo 1 associado à função linfocitária (<i>Lymphocyte function-associated antigen 1</i>)
LPS	Lipopolissacarídeo
LT	Linfócitos T
LTh2	Linfócitos T <i>helper</i> tipo 2
LTreg	Linfócito T regulatório
MBP	Proteína básica de mielina
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
MOG	Glicoproteína de mielina associada ao oligodendrócito (<i>myelin oligodendrocytes glycoprotein</i>)
NA	Noradrenalina
NADPH	Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina (<i>Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate</i>)
NF-κB	Fator nuclear kappa B
NK	Célula <i>natural killer</i>
NO	Óxido nítrico
OMS	Organização Mundial da Saúde
ON	Neurite óptica
PLP	Proteína proteolipídica de mielina

PP	Progressiva primária
PR	Progressiva remissão
PS	Progressiva secundária
PVN	Células neurosecretoras do núcleo paraentricular
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SNC	Sistema nervoso central
SOD	Superóxido dismutase
SR	Surto-remissão
TCR	Receptor de célula T
TGF- β	Fator de transformação de crescimento beta
Th1	Linfócito T <i>helper</i> tipo 1
Th17	Linfócito T <i>helper</i> tipo 17
TLR4	Receptor do tipo Toll 4 (<i>Toll-like receptor-4</i>)
TNF	Teste de nado forçado
TNF-alfa	Fator de necrose tumoral alfa
TRL	Receptor do tipo <i>Toll</i>
TSC	Teste de suspensão pela cauda
VCAM-1	Molécula de adesão celular-1
VLA-4	Integrina $\alpha 4\beta 1$

SUMÁRIO

Capítulo I - ESCLEROSE MÚLTIPLA

1. INTRODUÇÃO	12
1.1 EPIDEMIOLOGIA	13
1.2 ETIOLOGIA	14
1.3 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DA ESCLEROSE MÚLTIPLA (EM)	15
1.4 MODELO EXPERIMENTAL DE EM	16
1.5 PATOGÊNESE DA ENCEFALOMIELITE AUTOIMUNE EXPERIMENTAL (EAE).....	19

Capítulo II - DEPRESSÃO

2. INTRODUÇÃO.....	21
2.1. HIPÓTESE INFLAMATÓRIA E NEURODEGENERATIVA.....	22
2.2. MODELO EXPERIMENTAL DE DEPRESSÃO.....	24
2.3. LIPOPOLISSACARÍDEO (LPS).....	25
3. ÁCIDO ROSMARÍNICO.....	27
4. JUSTIFICATIVA.....	29
5. OBJETIVOS.....	30
5.1. OBJETIVO GERAL	30
5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	31
6. MATERIAL E MÉTODOS.....	31
6.1. ANIMAIS	31
6.2. INDUÇÃO DA EAE.....	31
6.3. MODELO DE INDUÇÃO DA DEPRESSÃO PELO LPS.....	32
6.4. PROTOCOLO DE TRATAMENTO.....	33
6.4.1. PROTOCOLO DE TRATAMENTO DURANTE O DECURSO DA EAE.	33
6.4.2. PROTOCOLO DE TRATAMENTO DURANTE O MODELO EXPERIMENTAL DE DEPRESSÃO.....	33
6.5. TESTES COMPORTAMENTAIS.....	34
6.5.1. SUSPENSÃO PELA CAUDA (TSC).....	34

6.6.2. CAMPO ABERTO.....	34
6.6.3. TESTE DE <i>SPLASH</i>	35
6.6. ANÁLISE ESTADÍSTICA.....	36
7. RESULTADOS	36
7.1. TRATAMENTO PREVENTIVO E TERAPÉUTICO COM AR REDUZ O SURGIMENTO DOS SINAIS CLÍNICOS E A PERDA DE PESO INDUZIDOS PELA EAE.....	37
7.2. TRATAMENTO AGUDO E REPETIDO COM AR PREVINE OS COMPORTAMENTOS TIPO- DEPRESSIVO INDUZIDO POR LPS.....	39
8. DISCUSSÃO.....	43
9. CONCLUSÃO	45
REFERÊNCIAS	47

CAPÍTULO I - ESCLEROSE MÚLTIPLA

1. INTRODUÇÃO

A esclerose múltipla (EM) é uma doença autoimune, neuroinflamatória crônica e desmielinizante do sistema nervoso central (SNC), que afeta tanto o cérebro como a medula espinhal, conduzindo a incapacidade e a perdas psicossociais (SIQUEIRA; PIRES, 2016; SILVA; NASCIMENTO, 2014; BARKER et al., 2014).

A gênese da doença ocorre a partir de uma lesão, a qual induz uma resposta autoimune, caracterizada por infiltrado linfocitário multifocal, especialmente linfócitos TCD4+ e linfócitos B, os quais em conjunto promovem dano axonal, morte de neurônios e oligodendrócitos. Além disso, a principal marca da EM é a perda da bainha de mielina – desmielinização – induzida pela resposta autoimune, a qual resulta no aparecimento dos sinais e sintomas motores, sensoriais e cognitivos. As lesões desmielinizantes alteram a condução do impulso nervoso neuronal, e contribuem para o déficit neurológico que varia com a localização das placas desmielinizadas no SNC. Ainda, o infiltrado celular da periferia para dentro do SNC pode ser facilitado pela perda da integridade da barreira hemato-encefálica (BHE) durante o processo de neuroinflamação (CABREIRA; CECCBINT, 2006).

A etiologia da EM é desconhecida, ainda que existam evidências de causas multifatoriais (SILVA; NASCIMENTO, 2014). A hipótese patogênica mais aceita fundamenta-se na associação entre fatores genéticos e ambientais, os quais desencadeiam uma resposta autoimune contra a bainha de mielina, gerando morte de oligodendrócitos e desmielinização, o que culmina com a alteração na condução dos impulsos nervosos. Em conjunto, essas reações resultam no surgimento dos sintomas motores, sensoriais e cognitivos típicos da doença (MOREIRA et al., 2000). Segundo Cabreira e Ceccbint (2006) as áreas da mielina destruídas pela resposta neuroinflamatória são referidas como “lesões” ou “placas” e dependendo do local promoverão o aparecimento de sinais e sintomas distintos, conforme ilustrado abaixo (QUADRO 1).

QUADRO 1. Localização do local da lesão correspondente aos sinais e sintomas decorrentes nos pacientes com EM. Imagem adaptada de Cabreira; Ceccbint (CABREIRA; CECCBINI, 2006).

Localização da Lesão	Sinais e Sintomas
Cerebelo	Desequilíbrio, disfunção motora e tremores.
Nervos motores	Fraqueza muscular, paralisia espástica, problemas visuais, alterações patológicas na bexiga e no intestino.
Nervos sensitivos	Alterações na sensibilidade, dormência, parestesia, sensação de queimação.

1.1. EPIDEMIOLOGIA

A EM representa uma importante doença neurológica, devido à sua cronicidade e por acometer adultos jovens, na faixa etária de 20-40 anos de idade, com prevalência global estimada em 2,3 milhões de portadores em 2013 (ONTANEDA et al., 2017). Além disso, a EM afeta com maior prevalência mulheres na proporção de 2:1, com quatro formas clínicas distintas: EM reincidente-remitente; EM progressiva primária; EM progressiva secundária, e EM progressiva reincidente (FINKELSZTEJN et al., 2009; ERRANTE; FERRAZ; RODRIGUES, 2016).

A EM acomete cerca de 100.000 pessoas no Reino Unido, sendo a causa mais comum de deficiência física adquirida em diferentes países da América do Norte e Europa (BARKER et al., 2014; FINKELSZTEJN et al., 2009; SILVA; NASCIMENTO, 2014). De maneira geral, a incidência e prevalência da EM diferem dependendo das regiões do mundo, apresentando maior concentração de pacientes portadores de EM em regiões distantes do equador. Na Europa e América do Norte a incidência é cerca de 6/100.000/ano e a prevalência de 1/1000 (WEISSERT, 2013). A EM afeta aproximadamente 400.000 pessoas somente nos Estados Unidos, a maioria deles jovens adultos, sendo que aproximadamente 87% dos pacientes apresentam a EM reincidente-remitente (EMRR), caracterizada por ataques agudos (recaídas), seguido de recuperação parcial ou completa (remissão) (LOMA; HEYMAN, 2011).

No Brasil, a prevalência da EM é de 15 casos/100.000 habitantes na região sudeste, porém, devido à grande extensão territorial brasileira, o país é considerado de baixo-média prevalência, pois as áreas de clima tropical e

equatorial exibem taxas menores (5 casos/100.000 habitantes), tal como ocorre na cidade de Recife (taxa de 1,36 casos/100.000 habitantes) (FINKELSZTEJN et al., 2009).

1.2. ETIOLOGIA

A inflamação do SNC é a principal causa de danos na EM, embora os elementos específicos que iniciam esta inflamação ainda não sejam completamente entendidos. Pesquisas sugerem que as causas são multifatoriais, tais como: suscetibilidade genética, mecanismos autoimunes, exposição a fatores estressores, redução da exposição solar, tabagismo e infecções virais (SILVA; NASCIMENTO, 2014; LOMA, HEYMAN, 2011). Por exemplo, fatores genéticos influenciam a susceptibilidade à patogênese da EM (OLSSON; BARCELLOS; ALFREDSSON, 2016). Oliveira e Souza (1998) realizaram estudo em gêmeos que constataram susceptibilidade 40 vezes maior entre os familiares de primeiro grau de pacientes com EM (OLIVEIRA; SOUZA, 1998). Além disso, alguns autores descrevem as regiões do antígeno leucocitário humano (HLA) como sendo o *locus* de susceptibilidade mais importante para a EM (EBERS et al., 1996; KAIMEN-MACIEL et al, 2009; SCHMIDT; WILLIAMSON; KOCH, 2007; ROJAS et al., 2010; ALVES-LEON et al., 2007; OLSSON; BARCELLOS; ALFREDSSON, 2016), tais como o *locus* HLA localizado nos cromossomos 6p2110p15, 5p13 e 1p36 (OLIVEIRA; SOUZA, 1998). Isso ocorre devido ao fato de que as moléculas de HLA, de classe I e II, participam do processo de reconhecimento e apresentação dos antígenos aos linfócitos T e são expressas, principalmente, por células apresentadoras de antígenos (APC's) tais como: macrófagos, células dendríticas e linfócitos B, além de possuírem a capacidade de ligar-se a determinados peptídeos próprios e apresentá-los às células do sistema imunológico, desencadeando assim a resposta autoimune. As variantes de genes de classe II codificam produtos que apresentam antígenos para os linfócitos T CD4+, enquanto os produtos de classe I apresentam antígenos para linfócitos T CD8+ (EBERS et al., 1996; OLSSON; BARCELLOS; ALFREDSSON, 2016).

Em contrapartida, a hipótese mais aceita da etiologia da EM está relacionada à infecção prévia, considerando o fato de que os patógenos possuem proteínas semelhantes àsquelas da mielina, contribuindo assim para a resposta autoimune e desenvolvimento de desmielinização da bainha de mielina, processo esse definido como mimetismo molecular. Vírus como *Epstein-Barr*, *Varicella zoster* e *Rubeolla virus* ou bactérias como o *Mycobacterium avium paratuberculosis* possuem em suas proteínas sequências polipeptídicas semelhantes àsquelas da proteína básica da mielina, as quais são reconhecidas como antígenos pelas APC's (OLIVEIRA; SOUZA, 1998; DO OLIVAL et al., 2013; MAMELI et al., 2014).

Ainda, fatores ambientais, como a exposição a agentes infecciosos, bem como a diminuição da exposição à luz solar e conversão de vitamina D, são considerados responsáveis por alterar o risco de EM. Atualmente, existe uma associação positiva entre a diminuição da exposição à luz solar, principalmente diminuição da exposição à radiação ultravioleta e subsequentemente culmina na diminuição do nível de calcifediol (pré-hormônio, o qual é convertido no rim à forma ativa da vitamina D) e a ocorrência de EM (ESMAEL; EL-SHERIF; ELAZZOUNY, 2016).

1.3. MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

Conforme descrito anteriormente, a EM pode ser subdividida em quatro tipos de manifestações clínicas, sendo eles: remitente-recorrente (EMRR), progressivo-secundária (EMPS), progressivo-primária (EMPM) e a progressivo-redicivante (EMPR) (DOUVARAS et al., 2014; GABY, 2013; CABREIRA; CECCBINT, 2006; KARACA et al., 2017).

A EMRR é a forma mais comum, a qual afeta aproximadamente 85% dos pacientes com EM, sendo caracterizada por crises (recidivas ou exacerbações) seguidas por períodos de remissão, quando os sintomas melhoram ou desaparecem (GOLDENBERG, 2012; KARACA et al., 2017). Além disso, a maioria dos portadores de EMRR evolui para a forma EMPS com considerável persistência dos sintomas motores com ou sem períodos de remissão ou nivelamento fora da severidade dos sintomas (platôs). Para muitos pacientes, o tratamento com agentes modificadores da doença auxilia no

retardo de tal progressão (GOLDENBERG, 2012; KARACA et al., 2017). A EMPM acomete cerca de 10% dos portadores, e os sintomas progridem consideravelmente desde o início da doença, com ausência de recaídas ou remissões, porém podendo ocorrer platôs ocasionais. Esta forma de EM é mais resistente às drogas tipicamente usadas para tratar a doença (GOLDENBERG, 2012; KARACA et al., 2017). A forma EMPR é rara, afetando menos de 5% dos pacientes. É a forma mais grave da doença, resultante de uma combinação de exacerbações e progressões desde o início, com crises intermitentes de piora dos sintomas no decurso da doença e com ausência de remissão (GOLDENBERG, 2012; OLIVEIRA; SOUZA, 1998; KARACA et al., 2017).

Os sintomas iniciais da EM podem ser divididos em sinais maiores e menores. Alterações piramidais, sensitivas e cerebelares são consideradas como os sinais maiores, e manifestações visuais e esfinterianas são sinais menores (OLIVEIRA; SOUZA, 1998; MOREIRA, 2000; HORNG; FABIAN, 2017). As alterações piramidais englobam fadiga, espasticidade, sinais de liberação piramidal (hiperreflexia, sinal de Babinski, clônus uni ou bilateral), enquanto as alterações cerebelares podem ser divididas em comprometimento do equilíbrio e da coordenação motora (OLIVEIRA; SOUZA, 1998; HORNG; FABIAN, 2017). O sintoma sensitivo mais comum são as parestesias, descritas como “formigamento” ou “adormecimento”, as quais podem estar associadas à hipoestesia superficial e/ou profunda em um ou mais membros (OLIVEIRA; SOUZA, 1998; HORNG; FABIAN, 2017). Sobre os principais distúrbios visuais, a neurite óptica (ON) é uma apresentação clínica inicial comum que ocorre durante todas as recaídas de EM, a qual normalmente evolui ao longo de dias ou semanas à medida que a lesão se desenvolve. A perda visual é geralmente unilateral, podendo variar de leve a moderada em gravidade. Inicialmente, o paciente experimenta um escotoma (escuridão de uma parte do campo visual) central, embora o padrão de perda visual também possa ser uniforme em todo o campo visual ou focal. Já o comprometimento esfinteriano que geralmente acontece é a incontinência ou retenção urinária e fecal. Pode-se observar também disfunção sexual (OLIVEIRA; SOUZA, 1998; HORNG; FABIAN, 2017).

1.4. MODELO EXPERIMENTAL DE EM

Segundo Garg e Smith (2015), o modelo experimental utilizado para o estudo da EM é baseado na inflamação neuronal induzida resultando em encefalomielite autoimune, sendo esse comumente conhecido como encefalomielite autoimune experimental (EAE) (SIQUEIRA; PIRES, 2016).

A EAE é uma doença desmielinizante do SNC que compartilha características clínicas e patológicas similares à EM, descrita pela primeira vez há cerca de 80 anos como modelo de doença desmielinizante, importante para estudar os mecanismos envolvidos na fisiopatologia da doença e no desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas (CONSTANTINESCU et al., 2011). O primeiro modelo foi descrito por Thomas Rivers em 1933 (RIVERS et al., 1933). Nesse trabalho, macacos desenvolveram sinais clínicos relacionados ao SNC, apresentando reações inflamatórias acompanhadas de desmielinização perivascular no mesencéfalo, medula e cerebelo, após receberem injeções de extratos de cérebros de coelhos (RIVERS et al., 1933). Atualmente, existem diferentes modelos de EAE, os quais apresentam variações nas linhagens de animais (preferencialmente roedores) e os tipos de antígenos utilizados para a indução. Em conjunto, esses modelos mimetizam as formas clínicas desenvolvidas também na EM. De maneira geral, os animais são sensibilizados com proteínas da mielina e desenvolvem um processo similar a EM, principalmente, àquelas relacionados aos sintomas motores, sensoriais e cognitivos. A partir de evidências obtidas utilizando-se este modelo muitos dos processos imunopatológicos da EM são hoje conhecidos (SIQUEIRA; PIRES, 2016). Existem, três abordagens diferentes podem ser utilizadas para induzir a doença nos animais: imunização ativa, imunização passiva (transferência de células T encefalitogênicas para animais susceptíveis) e o modelo de EAE espontânea (sem manipulação exógena) (STROMNES; GOVERMAN, 2006). Nesse trabalho utilizamos o modelo de imunização ativa.

A doença, induzida por imunização ativa, pode ser induzida em ratos e camundongos através da imunização com antígenos derivados de mielina (*myelin basic protein* – MBP, *proteolipid protein* – PLP, *myelin oligodendrocyte glycoprotein* – MOG ou peptídeos derivados destas proteínas) em associação

ao adjuvante completo de *Freund* (LINK; XIAO, 2001; MINICUCCI et al., 2010; STROMNES; GOVERMAN, 2006).

A EAE induzida com o peptídeo MOG₃₅₋₅₅ em camundongos C57BL/6 induz uma doença monofásica, com surgimento dos sintomas entre os dias 9-14 após a indução, com pico entre os dias 15 - 20, seguidos de recuperação lenta e parcial, a partir do dia 35 pós-indução. Os sintomas clínicos associados à EAE podem ser evidenciados através dos escores locomotores, assim como pela perda de peso corporal (STROMNES; GOVERMAN, 2006), conforme ilustrado na Tabela 2.

Escore	Sinais clínicos	Observações
0	Sem sinais	Os animais ficam com as patas posteriores estendidas; a cauda enrola no objeto cilíndrico; andar normal.
0,5	Perda parcial do tônus da cauda	Os animais ficam com as patas posteriores estendidas; ponta da cauda caída e/ou não enrola no objeto cilíndrico; andar normal.
1	Perda total do tônus da cauda	Os animais ficam com as patas posteriores estendidas; cauda caída e não enrola no objeto cilíndrico; anda normal.
2	Perda na coordenação dos movimentos, paresia das patas posteriores	Os animais contraem as patas posteriores quando são segurados pela cauda; os animais caminham com falta de coordenação nos movimentos; os animais apresentam reflexo nas patas quando apertadas; cauda sem tônus.
2,5	Uma das patas paralisadas	Os animais arrastam uma das patas; uma das patas não responde ao reflexo.
3	Patras posteriores paralisadas	Ambas as patas posteriores paralisadas; os animais arrastam ambas as patas posteriores e ambas não respondem ao reflexo.
3,5	Fraqueza nas patas anteriores	Patras posteriores arrastadas; patas dianteiras com dificuldades de mover o corpo; ambas as patas não respondem ao reflexo.
4	Paralisia das patas anteriores	Os animais não se movem; as patas posteriores e anteriores não respondem ao reflexo.
5	Moribundo/Morte	Morte. Nenhum movimento; frio ao toque, respiração alterada. Animais sacrificados.

QUADRO 2. Avaliação clínica dos animais durante o decurso da EAE, relacionada ao escore dos sinais clínicos associados ao desenvolvimento da EAE. FONTE: DUTRA et al., 2012.

1.5. PATOGÊNESE DA EAE

A EAE se caracteriza tanto pela inflamação por células mononucleares (monócitos e linfócitos), quanto por desmielinização, as quais se assemelham a

EM nos portadores humanos. A EAE é mediada por linfócitos T, especialmente o subtipo Th17 e Th1, específicos contra antígenos de mielina, os quais migram da circulação sanguínea para o SNC, através da BHE (O'CONNOR et al., 2008). O modelo murino MOG₃₅₋₅₅ vs. C57BL/6 tem sido bastante útil na indução de EAE persistente, severa e sem remissões (SOSPEDRA; MARTIN, 2005). Esta proteína tem sido objeto de estudos que sustentam a possibilidade dela ser o antígeno-alvo primário no desenvolvimento da EM nos humanos (MENDEL et al., 1995; SILVA; PAULA; FERREIRA, 2008).

Após o reconhecimento de peptídeos pelas APC's, essas migram para o tecido linfóide periférico e apresentam os antígenos aos linfócitos T naive (CHASTAIN et al., 2011; KRUMBHOLZ et al., 2012; GANGULY et al., 2013). Assim, estes linfócitos T se diferenciam em células Th1 - produtoras de interferon- γ (IFN- γ) e, principalmente, Th17 - produtoras de IL-17, IL-22 e IL-21 (MCFARLAND; MARTIN, 2007). A célula Th17 tem demonstrado alto potencial patogênico na EM, uma vez que expressa marcadores de ativação, co-estimuladores e moléculas de adesão maiores que as células Th1 (BRUCKLACHER-WALDERT et al., 2009).

Inicialmente, acreditava-se que os linfócitos Th1 eram as principais células envolvidas na patogênese da EM, tal como na EAE. Essa conclusão foi baseada no fato de que animais nocautes para a citocina IL-12p40 (IL-12p40^{-/-}) eram resistentes a EAE, considerando que a IL-12 é necessária para a diferenciação das células Th1 (PANITCH et al., 1987). Além disso, o tratamento com IFN- γ , citocina produzida, preferencialmente, por linfócitos Th1, exacerbou a doença, no entanto, camundongos nocautes para IFN- γ ^{-/-} ou ativador de transcrição-1 (STAT-1)^{-/-} desenvolvem EAE com maior gravidade (BETTELLI et al., 2004). Outros dados demonstram que a transferência de linfócitos Th17 induz EAE com maior severidade quando comparada com a transferência de células Th1. Por esta razão, acredita-se que os linfócitos Th17 sejam as principais células envolvidas com o surgimento e manutenção das doenças autoimunes no SNC como, por exemplo, a EM (FROHMAN et al., 2006; MCFARLAND; MARTIN, 2007; GOVERMAN, 2009).

De acordo com Goverman (2009), o processo de desmielinização inicia-se com a ativação de linfócitos T CD4⁺ Th1 e Th17 pelas células dendríticas,

as quais apresentam antígenos de mielina a essas células nos órgãos linfóides periféricos. Após a ativação periférica, as células T autoreativas entram no SNC cruzando a BHE através do plexo coroide, auxiliadas não somente pelo aumento da expressão de citocinas inflamatórias, como também por moléculas de adesão, integrinas e receptores de quimiocinas expressos nas células endoteliais da BHE. Neste contexto, talvez as moléculas de adesão como as selectinas (E-, P-, e L-Selectinas) e as interações de integrinas VLA-4 (*very late antigen-4*) e LFA-1 (*lymphocyte function associated antigen-1*) sejam as mais importantes. Além disso, um dos mecanismos propostos para esta transmigração é que a ativação das células endoteliais da BHE através dos receptores de reconhecimento padrão, tal como o receptor do tipo *Toll-like 4* (TLR4, *Toll-like Receptor-4*) induz alta expressão de P-selectinas, facilitando assim a transmigração das células T para dentro do SNC (RACKE et al., 2005). E por fim, a ativação recorrente dos receptores TLRs nos astrócitos parece ser capaz de aumentar a produção de IL-6 e outras quimiocinas, aumentando assim o recrutamento de células com potencial inflamatório para dentro do SNC (FARINA et al., 2005).

CAPÍTULO II – DEPRESSÃO

2. INTRODUÇÃO

A depressão é uma importante enfermidade da sociedade atual, com prevalência aproximada de 21% na população de alguns países desenvolvidos. Além disso, segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), a depressão é uma das dez principais causas de morbidade e mortalidade em todo o mundo (BETTIO et al., 2011). Sendo definida como um distúrbio heterogêneo, frequentemente manifestado por sintomas psicológicos, comportamentais e fisiológicos (MACHADO et al., 2012). É considerada uma das principais condições neuropsiquiátricas do mundo moderno (prevalência de 10-30% em mulheres e 7-15% em homens) e é prevista pela OMS como a principal causa de doença para o ano de 2030 (TIERNEY, 2007; COLLA et al., 2012).

O conceito de doença depressiva existe desde o século II D.C e já, nessa época, existiam relatos médicos de pacientes com transtornos de humor (SARTORIUS, 2001). Contudo, foi apenas no final do século XIX que o psiquiatra alemão Emil Kraepelin apresentou uma classificação diagnóstica para a depressão, diferenciando-a da esquizofrenia e de outras doenças mentais (ANGST; GAMA, 2008). Atualmente, segundo o Manual Estatístico e Diagnóstico da Associação Norte-Americana de Psiquiatria, em sua quarta versão (DSM-5), os distúrbios afetivos podem ser classificados em distúrbios depressivos (depressão maior, distímia e tipos não-especificados) e distúrbios bipolares. Os sintomas da depressão incluem componentes emocionais e biológicos. Dentre os componentes emocionais estão a apatia e o pessimismo, baixa autoestima, sentimentos de culpa e de inadaptação, assim como a indecisão e a perda de motivação. Enquanto os sintomas biológicos incluem o retardo de pensamento e de ação, a perda da libido, distúrbio do sono e perda do apetite (RANG et al., 2016).

A depressão maior é ainda conhecida por ser acompanhada pelas respostas imunoinflamatórias. Pacientes com depressão maior apresentam: *i)* aumento no número de leucócitos sanguíneos periféricos, relacionados ao desequilíbrio linfócitos T CD4+/CD8+; *ii)* aumento na concentração plasmática de proteínas de fase aguda, tais como a haptoglobina e a proteína C reativa; *iii)* diminuição na resposta celular a patógenos; *iv)* redução no número de linfócitos

e da atividade de células *Natural Killer* (NK); v) alteração na expressão de antígenos; vi) além do aumento nos níveis sanguíneos de citocinas pró-inflamatórias e seus receptores, tais como IL-6 e IL-23. Logo, tem-se sugerido que o aumento na produção de citocinas pró-inflamatórias e o desequilíbrio na resposta Th1/Th2 poderiam desempenhar papel relevante na fisiopatologia da depressão (VISMARI; ALVES; PALERMO-NETO, 2008).

Ainda, a partir do surgimento da hipótese monoaminérgica, grande avanço ocorreu na compreensão da neurobiologia da depressão. Segundo esta hipótese, a depressão ocorre a partir da menor disponibilidade de aminas biogênicas cerebrais, em particular serotonina (5-HT), noradrenalina (NA) e/ou dopamina (DA). Tal proposição é reforçada pelo conhecimento do mecanismo de ação dos antidepressivos, o qual se baseia, principalmente, no aumento da disponibilidade desses neurotransmissores na fenda sináptica, seja pela inibição (seletiva ou não) de suas recaptações, seja pela inibição da enzima responsável por suas degradações (tal como os inibidores da enzima monoaminoxidase) (HIRSCHFELD, 2010; VISMARI; ALVES; PALERMO-NETO, 2008; DOBOSZEWSKA et al., 2017).

A hiperatividade do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) é outro forte correlato biológico da depressão (FERRARI; VILLA, 2016). Diferentes fatores regulam a atividade do eixo HPA, tais como a inervação direta catecolaminérgica, serotoninérgica e dopaminérgica nos neurônios produtores de hormônio liberador de corticotropina (HLC) no hipotálamo, os quais parecem influenciar a liberação de HLC (JURUENA; CLEARE; PARIANTE, 2004). Neurotransmissores noradrenérgicos e serotoninérgicos têm sido implicados na resposta ao estresse, medo e ansiedade (MILLAN, 2003; WIECZOREK et al., 2005).

2.1. HIPÓTESE INFLAMATÓRIA E NEURODEGENERATIVA DA DEPRESSÃO

Os primeiros trabalhos demonstrando o componente neuroinflamatório da depressão, através da ativação de células mononucleares, surgiram na década de 80. A partir dessas descobertas, uma nova hipótese para o desenvolvimento e progressão da depressão passou a ser considerada,

pautada nos seguintes pilares: monoaminas vs. inflamação vs. ativação da resposta imunológica (MAES et al., 1993). O pesquisador Smith, em 1991, propôs pela primeira vez qual seria o papel das citocinas na depressão, sob a forma da "teoria de macrófagos de depressão" e aprofundados os estudos por Maes e colaboradores no início da década de 90 (SMITH, 1991; MAES; SONG; YIRMIYA, 2012). As citocinas pró-inflamatórias são responsáveis pela resposta da fase aguda na inflamação, contribuindo para diferentes aspectos clínicos da depressão, tais como hiperatividade do eixo HPA e distúrbio no metabolismo da serotonina (MAES, 1994; FERRARI; VILLA, 2016; GROSSO; VALENTÃO; ANDRADE, 2016). Ainda, as citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , IL-6 e TNF- α) podem influenciar tanto o metabolismo de NA, 5-HT e DA como as funções neuroendócrinas, levando ao achatamento da curva de cortisol e ao aumento das concentrações de cortisol noturno, sugerindo a existência de uma ligação entre a ativação do eixo HPA e a resposta depressiva (GROSSO; VALENTÃO; ANDRADE, 2016).

As diminuições induzidas pelo estresse no nível de Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (BDNF) e na neurogênese estão relacionadas, em parte, com a indução da liberação de citocinas imunes inatas. Além disso, a administração tanto de IFN- α como de vacinação tifóide para humanos pode alterar neurocircuitos – relevantes no estabelecimento do humor – incluindo núcleos da base e córtex cingulado anterior dorsal, as quais controlam comportamentos relacionados à atividade motora, motivação, ansiedade e reações de alarme (GROSSO; VALENTÃO; ANDRADE, 2016; GULYAEVA, 2017). As respostas adaptativas ao estresse envolvem a ativação do eixo HPA. No entanto, é necessária uma regulação eficiente para retornar os níveis do hormônio aos níveis basais, uma vez que a estimulação excessiva ou reatividade do eixo HPA pode desencadear estado de sofrimento prolongado, comprometimento do sistema límbico e aumento do risco de transtornos psiquiátricos (GOEL et al., 2014). Nos últimos 30 anos, tornou-se evidente a observação da hiperatividade do eixo HPA em um subconjunto de pacientes com depressão maior (VARGHESE; BROWN, 2001; GROSSO; VALENTÃO; ANDRADE, 2016).

O eixo HPA consiste em um *loop* de retroalimentação, o qual compreende o hipotálamo, a glândula pituitária e as glândulas adrenais, sendo ativado durante um estresse emocional. As células neurosecretoras do núcleo paraventricular (PVN) do hipotálamo recebem inputs neuronais de diferentes regiões cerebrais, incluindo amígdala, hipocampo e núcleos do mesencéfalo (MCQUADE; YOUNG, 2000; VARGHESE; BROWN 2000; GROSSO; VALENTÃO; ANDRADE, 2016). O estresse é percebido pelo córtex cerebral, transmitido ao hipotálamo como consequência à ativação do eixo HPA. A atividade do eixo HPA é regulada pelo fator liberador de hormônio adrenocorticotrópico (CRF) e vasopressina (AVP), secretados pelo hipotálamo, que por sua vez estimulam a hipófise a liberar o hormônio adrenocorticotrópico (ACTH), que ativa a secreção de glicocorticoides (cortisol em humanos e corticosterona em roedores) a partir do córtex da glândula adrenal. Glicocorticoides irão ligar-se a seus receptores localizados dentro do eixo HPA, bem como, nos locais em que exercem o controle de *feedback* sobre a liberação de CRF, AVP e ACTH (FERRARI; VILLA, 2016). Os glicocorticoides não só controlam as funções periféricas, o metabolismo e a resposta imunológica, mas também apresentam diferentes efeitos centrais, tais como: regulam a sobrevivência neuronal, a neurogênese, o tamanho hipocampal, a formação e aquisição de novas memórias e a avaliação emocional de eventos, representando assim um importante elo entre o estresse vs. funcionamento cerebral (FERRARI; VILLA, 2016). Ainda, alguns estudos observaram o aumento da atividade do eixo HPA em pacientes deprimidos, os quais apresentaram 1) níveis aumentados de cortisol na saliva, plasma e urina, 2) aumento no nível de CRF no líquido cefalorraquidiano (LCR) e nas regiões cerebrais límbicas; e 3) aumento do tamanho (bem como da atividade) das glândulas pituitária e adrenais, sugerindo que essa hiperativação do eixo HPA esteja, provavelmente, relacionada com as alterações no controle inibitório de *feedback* exercidos pelos glicocorticoides endógenos (FERRARI; VILLA, 2016; GROSSO; VALENTÃO; ANDRADE, 2016).

2.2. MODELO EXPERIMENTAL DEPRESSÃO

Estudos anteriores demonstraram que a aplicação de estímulos físicos e/ou psicológicos intensos a animais de experimentação constituem fator estressante capaz de induzir alterações fisiológicas e comportamentais similares àquelas observadas em indivíduos deprimidos e, principalmente, de maneira sensível ao tratamento com drogas antidepressivas (WILLNER, 1985; MCARTHUR; BORSINI, 2006). Assim, a exposição de animais de experimentação a situações estressantes não controláveis vêm sendo empregada como uma importante ferramenta experimental no estudo da neurobiologia da depressão (WILLNER, 1997; MATHEW et. al., 2005; MCARTHUR; BORSINI, 2006). Alguns desses exemplos são: o teste do nado forçado (TNF) (PORSOLT et al., 1977), o teste de suspensão pela cauda (TSC) (MCARTHUR; BORSINI, 2006) e desamparo aprendido (WILLNER, 1985).

O TSC é amplamente utilizado para a investigação da ação antidepressiva de novos compostos, assim como para compreender o "comportamento tipo depressivo". Particularmente, o teste avalia o tempo de imobilidade dos roedores expostos a uma situação estressante inevitável, neste caso a suspensão pela cauda a partir de uma estrutura fixa, normalmente durante um período pré-definido, comumente 6 minutos (BARKUS, 2012). Assim, após um período inicial de movimentação ativa, o animal eventualmente exibe uma postura imóvel, sendo que no TSC, a imobilidade é marcada quando os animais deixam de apresentar movimentos ativos de tronco e membros (KRISHNAM; NESTLER, 2011). No TSC, a imobilidade tem sido interpretada como uma expressão de desespero comportamental ou de aprisionamento, que pode ser revertida pela administração de fármacos antidepressivos. Diferentes fármacos que atuam independentemente da sinalização de monoamina também têm sido eficazes em reduzir o tempo de imobilidade, tais como a grelina, quetamina e estradiol (KRISHNAM; NESTLER, 2011).

2.3. LIPOPOLISSACARÍDEO (LPS)

Lipopolissacarídeo (LPS), também conhecido como endotoxina, é uma molécula altamente tóxica, derivada da membrana celular externa de bactérias gram-negativas, tal como *Escherichia coli*, liberada durante o processo de

multiplicação bacteriana ou de fagocitose realizada pelas células do sistema imune inato (TUIN et al., 2006; CRUZ-MACHADO, 2010). O LPS é um glicolípido exclusivamente bacteriano, composto por duas camadas de açúcar (região hidrofílica) e uma camada lipídica (região hidrofóbica), essa responsável pela ação antigênica do LPS, incluindo indutor de inflamação sistêmica (RIESTSCHEL et al., 1994; RAETZ; WHITFIELD, 2002; CRUZ-MACHADO, 2010). Por esta razão, o LPS é considerado importante agente pró-inflamatório particularmente indutor da resposta imune inata, através da interação com os receptores de reconhecimento padrão, tal como o TLR4 (LANGHANS, 1996), contribuindo ainda para os comportamentos tipo-depressivos em animais (DANTZER, 2007; KONSMAN; PARNET; DANTZER, 2002; DANTZER et al., 2008). Sua administração sistêmica induz inflamação periférica e central, tanto em animais como em seres humanos (CONNOR et al., 1998; DUNN et al., 1999). Além disso, o LPS atua como pirógeno exógeno e ativador de macrófagos, induzindo-os a liberar citocinas, tais como TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8, dentre outras (TURNBULL; RIVIER, 1999).

Estudos descrevem que a administração sistêmica de LPS induz aumento no espectro de respostas comportamentais tipo-depressivas em camundongos (HART, 1988; KENT et al., 1992; DANTZER et al., 2001; NA et al., 2015). Esse comportamento induzido pela administração periférica de LPS está vinculado ao comportamento da doença e à ativação aguda do sistema imune inato periférico. Os camundongos sensibilizados exibem diferentes alterações comportamentais bem caracterizadas, tais como redução no consumo de água e comida, redução da atividade exploratória e sonolência aumentada (NA et al., 2015). Estudos relataram que uma baixa dose de LPS foi eficaz na indução de comportamentos tipo-depressivos em ratos *wistar* e camundongos *Swiss* (LINTHORST; REUL, 1998; LACOSTA; MERALI; ANISMAN, 1999). O LPS também induz mudanças fisiológicas, como àquelas associadas ao estresse físico ou psicogênico em animais (ANISMAN et al., 2002), assim como ativa o metabolismo de NA e 5-HT (DUNN, 1999; DUNN, 2006), conseqüentemente ativando o eixo HPA, culminando com o aumento das concentrações plasmáticas de ACTH e glicocorticoides (BESEDOVSKY et al., 1986; DUNN, 2000).

3. ÁCIDO ROSMARÍNICO

O ácido rosmarínico (AR) - O-caffeoil-3,4-diidroxifenil láctico (Figura 1) – foi isolado pela primeira vez em 1958, a partir das folhas do alecrim (*Rosmarinus officinalis* L), originando a sua nomenclatura atualmente utilizada. Posteriormente, o AR foi encontrado em diversas outras espécies pertencentes às famílias Lamiaceae, Boraginaceae, Blechnaceae (samambaias), Zosteraceae, Potamogetonaceae e Cannaceae (PETERSON; SIMMONDS, 2003). O AR é um polifenol derivado do ácido caféico e do ácido 3,4-diidroxifenilacético (SCARPATI; ORIENTE, 1958; FAZEL NABAVI et al., 2015; ERTAS et al., 2015; GÜLÇIN et al., 2016).

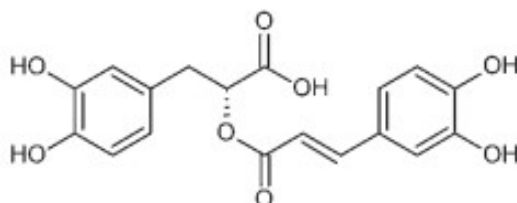


Figura 1. Estrutura química do AR. Fonte AMOAH et al., 2016.

Dentre as várias espécies vegetais que contém o AR destacam-se: *Lavandula angustifolia* (lavanda), *Lippia alba* (erva cidreira, chá de tabuleiro), *Lippia graveolens* (orégano mexicano), *Lippia origanoides* (salva de Marajó), *Melissa officinalis* (melissa), *Mentha arvensis* (hortelã), *Mentha piperita* (hortelã pimenta), *Mentha spicata* (hortelã-peluda), *Momordica charantia* (melão-de-são-caetano), *Monarda didyma* (bergamota), *Ocimum basilicum* (manjerição), *Origanum vulgare* (orégano), *Passiflora edulis* (maracujá), *Rosmarinus officinalis* (alecrim), *Rubus fruticosus* (amora silvestre), *Salvia officinalis* (sálvia), *Symphytum officinalis* (confrei), dentre outras (PETERSON E SIMMONDS, 2003; KOMES et al., 2011; ROY; MUKHOPADHYAY, 2012; AYRANCI; ERKAN, 2013; SALTAS et al., 2013; STASSHENKO et al., 2013).

Grande parte das atividades biológicas apresentadas pelo AR está relacionada às suas características antioxidantes e anti-inflamatórias, as quais são amplamente descritas na literatura. Estas ações estão associadas aos seus efeitos citoprotetores (AMOAH et al., 2016; HASANEIN et al., 2016; KELSEY et al., 2010; LUAN et al., 2013; FAZEL NABAVI et al., 2015; CHU et al., 2012; PETERSON; SIMMONDS, 2003; JIANG et al., 2009; ADOMAKO-

BONSU et al., 2017). Além disso, estudos *in vitro* demonstram que o AR possui efeitos antimutagênicos, antígenotóxicos, citotóxicos, antimetastáticos, antiangiogênicos, neuroprotetores, antimicrobianos e imunomoduladores (AMOAH et al., 2016; KU et al., 2013; MOON et al., 2010; ZHANG et al., 2011; KIM et al., 2009). O efeito anti-inflamatório do AR é decorrente da diminuição da expressão da enzima ciclooxigenase-2 (COX-2) e, conseqüentemente, nos níveis de prostaglandinas (BABA et al., 2004; YOUN et al., 2003; ADOMAKO-BONSU et al., 2017). Perreira e colaboradores (2005) demonstraram que o AR inibe a resposta inflamatória em células dendríticas derivadas da medula óssea estimuladas com LPS, enquanto Guginski e colaboradores (2009) demonstram o efeito analgésico do AR em modelos de dor aguda induzida pelo glutamato. O AR parece melhorar a sensibilidade à insulina com a manutenção dos níveis plasmáticos de lipídios (KARTHIK; VISWANATHAN; ANURADHA, 2011), sugerindo potencial mecanismo para o tratamento do diabetes (BERHOW et al., 2012; ADOMAKO-BONSU et al., 2017; GOVINDARAJ; PILLAI, 2015). Outros autores demonstram que os efeitos farmacológicos desempenhados pelo AR parecem correlacionar-se com a inibição do fator de transcrição NF-κB (PAPA; GOMES; ROCKWELL, 2007). Além disso, a eficácia antioxidante dos compostos fenólicos, tal como o AR, é atribuída à presença de quatro grupos hidroxila, tornando-os potentes agentes terapêuticos contra o dano oxidativo (GOVINDARAJ; PILLAI, 2015). Por esta razão, a grande capacidade antioxidante correlaciona-se com as ações neuroprotetora desses compostos, os quais sequestram as espécies reativas de oxigênio (ROS), tais como os peroxinitritos e peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (CHOI et al., 2002; QIAO et al., 2005; LEE et al., 2008).

Deste modo, com a comprovação de que o AR possui importante efeito antioxidante, surge o interesse de investigar se o mesmo apresenta efeito neuroprotetor em modelos de doenças neurodegenerativas relacionadas à produção de ROS (ALKAM et al., 2007; SHIMOJO et al., 2010). Embora a potência antioxidante do AR esteja bem estabelecida, os estudos relacionados ao seu efeito neuroprotetor ainda são escassos na literatura (JAYANTHY; SUBRAMANIAN, 2014; GOVINDARAJ; PILLAI, 2015). Nesse contexto, estudos pré-clínicos demonstraram que o AR exerce importante efeito protetor dos

neurônios dopaminérgicos durante a neurotoxicidade induzida pela 6-hidroxi-dopamina (6-OHDA), através de sua ação antioxidante e antiapoptótica, indicando assim seu potencial terapêutico para o tratamento da doença de Parkinson (REN et al., 2009; WANG et al., 2012). No SNC, alguns efeitos protetores do AR incluem: *i*) ação antiapoptótica das células gliais e neuronais quando estimuladas por H₂O₂ (GAO et al., 2005; GHAFFARI et al., 2014; LEE et al., 2008); *ii*) inibição do dano neuronal em modelo *in vitro* de estresse oxidativo, excitotoxicidade e isquemia/reperfusão (FALLARINI et al., 2009), *iii*) prevenção da neurotoxicidade induzida pela proteína β-amilóide em camundongos (ALKAM et al., 2007), e *iv*) inibição da mortalidade induzida por encefalite viral japonesa em camundongos, através do bloqueio da produção de mediadores inflamatórios, tais como o TNF, IL-6 e IL-12 (HOOKER; LOTT; HARRICH, 2001; TEWTRAKUL et al., 2003).

Igualmente, outro estudo demonstrou que o AR apresenta efeito antifúngico e antibacteriano, já que inibiu o crescimento da *Chlamydia pneumoniae*, bactéria responsável pela pneumonia atípica primária (SALIN, et al., 2011). Além disso, o extrato da planta *Kitaibelia vitifolia*, cujo componente majoritário é o AR, também possui atividade bactericida contra o *Staphylococcus aureus*, a *Klebsiella pneumoniae* e a *Proteus mirabilis*, assim como apresentou efeito fungicida contra os fungos *Candida albicans* e *Aspergillus niger* (MASKOVIC et al., 2011).

4. JUSTIFICATIVA

A EM é uma doença altamente incapacitante que afeta a qualidade de vida dos indivíduos induzindo prejuízos psicossociais e econômicos. As terapias atuais existentes para o tratamento da EM apresentam custo elevados associado a importantes efeitos adversos, dificultando assim a completa adesão ao tratamento, além de serem comumente drogas imunossupressoras. Atualmente, nenhum dos tratamentos existentes é capaz de curar a EM, mas apenas reduzir sua progressão. Por esta razão, a procura por terapias específicas que tenham ação sobre a resposta neuroinflamatória autoimune, característica desta doença, é intensa no meio científico. Estas pesquisas têm o objetivo de descobrir novos alvos terapêuticos para o tratamento da EM.

Alterações de humor, como euforia, depressão e estado de apatia nos pacientes com esclerose múltipla (EM) são conhecidas desde as primeiras descrições da doença (MENDES et al., 2003). A depressão é um dos transtornos de humor mais prevalente na sociedade, constituindo um grave problema de saúde pública, com índice de comorbidade em torno de 60 a 70% (NEMEROFF; OWENS, 2002; EBMEIER; DONAGHEY; STEELE, 2006; KALUEFF et al., 2007). Embora o tratamento atual para depressão seja normalmente seguro, o mesmo ainda não é ideal, já que possui algumas limitações, tais como: atraso na remissão dos sintomas, com grande latência entre o início do tratamento e a obtenção dos efeitos benéficos, efeitos colaterais severos (enxaqueca, náusea, aumento de peso, disfunção sexual, entre outros) (NEMEROFF; OWENS, 2002).

Assim, com os múltiplos efeitos adversos das drogas disponíveis no mercado e sua eficácia limitada em uma considerável proporção de pacientes, justificam-se os esforços na tentativa infatigável de encontrar novas substâncias com potencial ação terapêutica e posterior aplicação na prática clínica. A hipótese central desse trabalho é que o AR, através de sua eficaz atividade anti-inflamatória e antioxidante seja uma provável forma de tratamento das doenças neuroinflamatórias e neuropsiquiátricas. Pautado na ampla caracterização da problemática, espera-se que os resultados obtidos deste trabalho possam fornecer subsídios importantes para o maior entendimento dos mecanismos moleculares envolvidos na EM e depressão, podendo representar o desenvolvimento de uma nova opção terapêutica para o tratamento das doenças neuroinflamatórias e neuropsiquiátricas.

5. OBJETIVOS

5.1. OBJETIVO GERAL

No presente estudo avaliou-se o efeito neuroprotetor e antidepressivo do AR em modelos pré-clínicos de EM e depressão.

5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Caracterizar o efeito preventivo e terapêutico do AR durante o desenvolvimento da EAE;
- ✓ Avaliar o efeito antidepressivo agudo e repetido do AR no modelo de neuroinflamação induzida pela administração periférica do LPS em camundongos;

6. MATERIAL e MÉTODOS

6.1. ANIMAIS

Camundongos C57BL/6, fêmeas (8 semanas de idade) provenientes do Centro de Inovação e Ensaio Pré-clínicos (CIEnP, Florianópolis) e *Swiss* machos (2 – 3 meses de idade) provenientes do Biotério Central da UFSC foram utilizados para a indução da EAE e avaliação do comportamento tipo-depressivo, respectivamente. Os animais foram mantidos em gaiolas com ventilação, controle de temperatura (22 ± 2 °C) e umidade (40 – 70%) em ciclo de 12 horas claro-escuro, com livre acesso à água e ração. Os animais foram aclimatizados por no mínimo 1-2 horas antes do início dos testes comportamentais. Os procedimentos empregados no presente estudo foram aprovados no Comitê de Ética no Uso de Animais/UFSC (PP00956).

6.2. INDUÇÃO DA EAE

A EAE foi induzida com inoculação de 100 µL de emulsão contendo 200 µg de glicoproteína de mielina do oligodendrócito (MOG₃₅₋₅₅) suplementado com adjuvante incompleto de Freund (CFA) contendo 500 µg de *Mycobacterium tuberculosis* (Mt) H37RA (Difco, Detroit, MI, USA), em ambos os flancos traseiros. Além disso, cada animal recebeu 300 ng de *Bordetella toxina pertussis* em 200 µL de solução salina por via intraperitoneal no dia 0 e às 72 h pós-imunização (STROMNES; GOVERMAN, 2006; HOFSTETTER et al., 2002). Os animais foram pesados e examinados diariamente, durante 30 dias. Os sintomas da doença foram determinados através dos estágios conforme descrito a seguir: sem sinais clínicos (estágio 0), perda do tônus da cauda (estágio 1), paralisia leve dos membros posteriores e dificuldade de

endireitamento (estágio 2), paralisia severa dos membros posteriores e acometimento dos membros anteriores (estágio 3), tetraplegia e moribundos (estágio 4) ou morte (estágio 5). Os animais não foram classificados clinicamente antes do dia 7, assim, àqueles animais que responderam de forma aguda à imunização com MOG₃₅₋₅₅ não foram incluídos na análise estatística deste estudo. Os experimentos foram divididos em dois protocolos distintos. No primeiro foi avaliado o efeito preventivo do AR sobre a EAE, para isso os animais foram divididos em três grupos experimentais: grupo EAE; grupo tratamento preventivo (tratado do dia 0 ao dia 30) e grupo naive. No segundo protocolo avaliou-se o efeito terapêutico do AR sobre a EAE, para isso os animais foram divididos em três grupos: grupo EAE, grupo tratamento terapêutico (tratado do dia 15 ao dia 30) e grupo naive. Cada grupo foi composto por 6 animais escolhidos aleatoriamente. No 30º dia de análise, fase crônica da EAE, os animais foram eutanasiados, por overdose de pentobarbital (250 mg/Kg, i.p. + lidocaína 10%, i.p.).

6.3. MODELO DE INDUÇÃO DA DEPRESSÃO PELO LPS

LPS (*Escherichia coli*, serotipo 055: B5, Sigma-Aldrich Chemical Corp., St. Louis, MO. USA) foi usado para induzir o estado de depressão nos camundongos *Swiss* de 12 semanas de idade. O LPS foi injetado pela via intraperitoneal na dose de 0,5 mg/kg dissolvido em salina estéril 0,9% e isenta de endotoxina. A dose selecionada de LPS foi escolhida com base em estudo previamente publicado (FAIRCHILD et al., 2009). Os experimentos foram divididos em dois protocolos distintos. No primeiro foi investigado o efeito do tratamento agudo com AR sobre o comportamento tipo depressivo, para isso os animais foram divididos em quatro grupos: grupo naive; grupo tratamento agudo (administrado 1 hora antes do LPS), grupo controle positivo (tratado com imipramina, antidepressivo utilizado na prática clínica) e grupo LPS. No segundo protocolo foi avaliado o efeito do tratamento repetido com AR sobre o comportamento tipo depressivo, para isso os animais foram divididos em três grupos experimentais: grupo LPS, grupo tratamento repetido e grupo naive. Cada grupo foi composto por 6 animais escolhidos aleatoriamente. Para evitar a interferência do comportamento tipo-doente, comumente observado em

camundongos expostos ao LPS, às análises comportamentais foram realizadas 24 horas após a administração do LPS (DUNN; SWIERGIEL, 2005; XIE et al., 2012; MARTIN-DE-SAAVEDRA et al., 2013).

6.4. PROTOCOLO DE TRATAMENTO

6.4.1. PROTOCOLO DE TRATAMENTO DURANTE O DECURSO DA EAE

Os camundongos foram imunizados com MOG₃₅₋₅₅ e tratados com AR (50 mg/Kg, por via oral – gavagem) ou salina (veículo). A escolha da dose do AR utilizada foi baseada em protocolo piloto e trabalhos prévios (SOTNIKOVA et al., 2013; KIM et al., 2015; OU et al., 2017). O AR, com teor de pureza de 96%, obtido da Sigma Aldrich (USA), foi diluído em solução salina (0,9%) e utilizado para o tratamento dos animais em uma dose de 50mg/Kg v.o.

Os animais foram divididos em 3 grupos experimentais: i) animais tratados uma vez ao dia, durante os trinta dias após a imunização (dia 0 – 30: tratamento preventivo); ii) animais tratados após o surgimento dos sintomas motores (dia 15 ao dia 30: tratamento terapêutico). O grupo naive recebeu por via oral apenas solução salina (veículo).

6.4.2. PROTOCOLO DE TRATAMENTO DURANTE O MODELO EXPERIMENTAL DE DEPRESSÃO

Os camundongos foram imunizados com LPS (0,5 mg/Kg, i.p.) e tratados com AR (50 mg/Kg, por via oral): i) 1 hora antes da imunização com LPS (tratamento agudo) ou ii) diariamente, 1x/dia, durante 7 dias, sendo a última administração aplicada 1 hora antes do estímulo com LPS (tratamento repetido). Os animais do grupo controle positivo receberam imipramina 20 mg/Kg (i.p.) 1 hora antes do estímulo com LPS. Os animais do grupo controle receberam apenas a administração de LPS por via i.p., enquanto os animais naive não receberam nenhum tipo de tratamento.

6.5. TESTES COMPORTAMENTAIS

Os testes comportamentais descritos foram realizados somente nos animais Swiss, imunizados com LPS (grupo tratamento agudo com AR e grupo tratamento repetido com AR) e nos grupos controle (grupo naive e grupo

controle positivo tratado com imipramina), 24 horas após a imunização dos camundongos com LPS (0,5 mg/Kg, i.p.).

6.5.1. TESTE DE SUSPENSÃO PELA CAUDA (TSC)

O teste é baseado no fato de que os animais submetidos ao estresse inevitável de curto prazo, de ser suspensos pela cauda, desenvolverão uma postura imobilizada. Diferentes medicamentos antidepressivos invertem a imobilidade e promovem a ocorrência de comportamento relacionado à fuga (CRYAN; MOMBÉREAU; VASSOUT, 2005). Os animais foram colocados na posição teste e avaliados individualmente. Todos os animais dos 4 grupos descritos no item 6.5 foram avaliados no TSC. Cada animal foi suspenso 50 cm acima do chão, com auxílio de fita adesiva colocada aproximadamente a 1 cm da ponta da cauda, por 6 minutos. Em seguida, foi cronometrado o tempo de imobilidade (tempo total que o camundongo ficou imóvel no período de 6 minutos), o tempo de latência (tempo que o camundongo levou para ficar imóvel pela primeira vez) e a quantidade de vezes que o animal ficou imóvel, de acordo com o método desenvolvido por Steru e colaboradores (1985) (Figura 2).

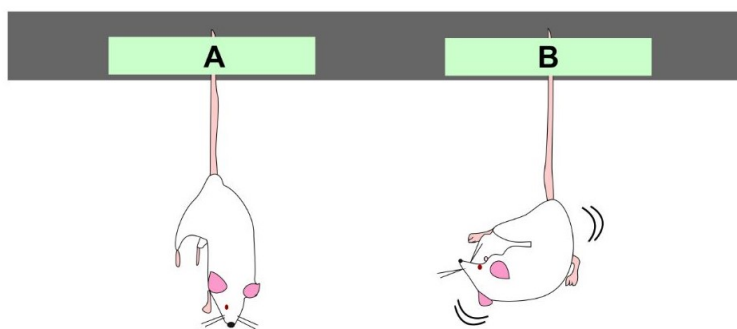


Figura 2. Teste de suspensão pela cauda (TSC). A: comportamento de imobilidade; B: comportamento ativo. FONTE: COLLA, 2015.

6.5.2. CAMPO ABERTO

Esse teste permite avaliar os efeitos das substâncias teste na atividade exploratória dos roedores – usado para avaliar o comportamento motor dos animais. Dessa forma, esse parâmetro comportamental permite a avaliação do nível de excitabilidade do SNC. A locomoção dos animais foi avaliada no teste do campo aberto, conforme descrito previamente (RODRIGUES et al., 1996). O

aparato consiste em uma caixa de madeira medindo 40 x 60 x 50 cm, no qual a base da arena é dividida em 12 quadrados iguais. Assim, o número de quadrados cruzados com as quatro as patas foi contado em uma sessão treino que teve a duração de 6 minutos, assim como o número de elevações verticais (Figura 3). Cada animal foi colocado individualmente e analisado por 6 min. Nos intervalos entre os animais o aparato foi limpo com álcool 70%. Todos os grupos de camundongos *Swiss* foram avaliados no teste.

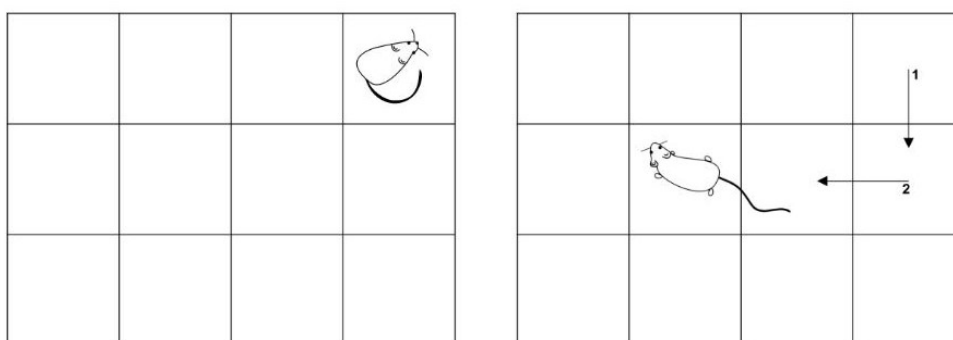


Figura 3. Teste do campo aberto demonstrando o número de cruzamentos realizados pelos animais. Figura adaptada de COLLA, 2015.

6.5.3. TESTE DE *SPLASH*

Este teste comportamental baseia-se no interesse do hábito de higiene dos roedores quando o pêlo está sujo. Assim, quando o animal está com o pêlo sujo ele faz o movimento estereotipado de autolimpeza ou *grooming*. Esse movimento tem uma organização padronizada, sequencial com característica progressão cefalocaudal (Figura 4) (KALUEFF, 2015). Para isso, 200 mL de solução de sacarose a 10% foram esguichados no dorso do camundongo com o animal dentro de aparato quadrado (para evitar qualquer outra distração). Imediatamente após, o tempo gasto na autolimpeza foi avaliado durante o período de 5 min - tempo de *grooming*, a latência para o primeiro *grooming* e números de *grooming* foram avaliados. Um alto tempo de latência e um baixo tempo de *grooming* estão relacionados a um comportamento de tipo depressivo – anedonia (perda da capacidade de sentir prazer).



Figura 4. Fases do movimento de *grooming* avaliadas no test *Splash*. Fase 1 consiste em uma série de "golpes de pata" bilaterais feitos perto do nariz (limpeza do nariz e da pata). Fase 2 consiste em uma série de movimentos unilaterais (cada um feito por uma pata) até embaixo do olho (limpeza da face). Fase 3 consiste em uma série de movimentos bilaterais para trás e para cima, feitos por ambas as patas simultaneamente (limpeza da cabeça). Fase 4 consiste em lambe o corpo que é precedida por uma transição postural cefalocaudal da pata - da limpeza da cabeça a limpeza do corpo. Figura adaptada de KALUEFF, 2015.

6.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os valores foram expressos como média \pm erro padrão da média (n corresponde ao número de animais por grupo incluído nas análises). As análises estatísticas foram avaliadas utilizando ANOVA de uma ou duas vias, seguida do teste de Bonferroni's para comparações múltiplas. Valores de $p < 0,05$ foram considerados de significância estatística, e utilizou-se o software GraphPad Prism 6 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) para as análises estatísticas necessárias.

7. RESULTADOS

O referido estudo foi realizado com 40 camundongos da linhagem *Swiss*, machos com 90 dias de idade, e massa corporal de 43 gramas em média, os quais foram divididos randomicamente, conforme segue: i) grupo LPS (n=16); ii) tratamento agudo com AR (n=8); iii) tratamento repetido com AR (n=8); iv) grupo naive (n=8). Os animais foram submetidos à tarefa do campo aberto, teste de suspensão pela cauda e teste de *splash*. Em outro bloco de resultados foram utilizados 18 camundongos da linhagem C57BL/6, fêmeas, com 8 semanas de idade e com massa corporal de 27 gramas em média. Esses foram subdivididos da seguinte forma: i) grupo naive (n=4); ii) grupo EAE (n=4); iii) tratamento preventivo com AR (n=5) e iv) tratamento terapêutico com AR (n=5), e posteriormente submetidos a análise do escore clínico da EAE e perda de peso corporal durante 30 dias.

7.1. TRATAMENTO PREVENTIVO E TERAPÊUTICO COM AR REDUZ O SURGIMENTO DOS SINAIS CLÍNICOS E A PERDA DE PESO INDUZIDOS PELA EAE

Neste primeiro bloco de resultados foi avaliado o efeito neuroprotetor do AR no modelo da EAE, através de dois diferentes protocolos: durante a fase de indução da doença (tratamento preventivo) e durante a fase crônica da EAE (tratamento terapêutico, na qual foi avaliado o efeito do AR, após o surgimento dos sintomas típicos da EAE, conforme descrito anteriormente). Os resultados apresentados nas Figuras 5 e 6 demonstram que os animais do grupo EAE apresentaram os primeiros sintomas de paralisia no dia 12 intra plantar (i.p.), atingindo o valor máximo de escore no dia 30 i.p. ($3,5 \pm 0,5$). Conforme ilustrado na Figura 5A, os animais tratados com AR do dia 0 ao dia 30 (tratamento preventivo) apresentaram menor escore clínico quando comparado aos animais do grupo EAE durante o decurso temporal da doença. Ressalta-se que os animais tratados com AR na dose de 50 mg/kg apresentaram os primeiros sintomas típicos da EAE apenas no 15º dia i.p., com escore clínico máximo de 2 no último dia da análise (Figura 5A). Os animais tratados com AR apresentaram uma taxa de inibição de 23% quando comparado ao grupo EAE (Figura 5B).

Além dos sinais de paralisia, a perda de peso corporal é também considerada uma manifestação clínica decorrente da EAE. De acordo com a Figura 5C, nos primeiros dias pós-imunização todos os animais apresentaram perda de peso. No entanto, no decurso da doença, pôde-se observar que os animais do grupo EAE apresentaram significativa perda de massa corporal em relação ao grupo controle (Figuras 5C e 5D). Por outro lado, o tratamento preventivo com AR (50 mg/kg, v.o.) inibiu a perda de peso induzida pela EAE (Figura 5C), assim como restaurou-a de maneira similar aos animais do grupo controle (Figura 5D).

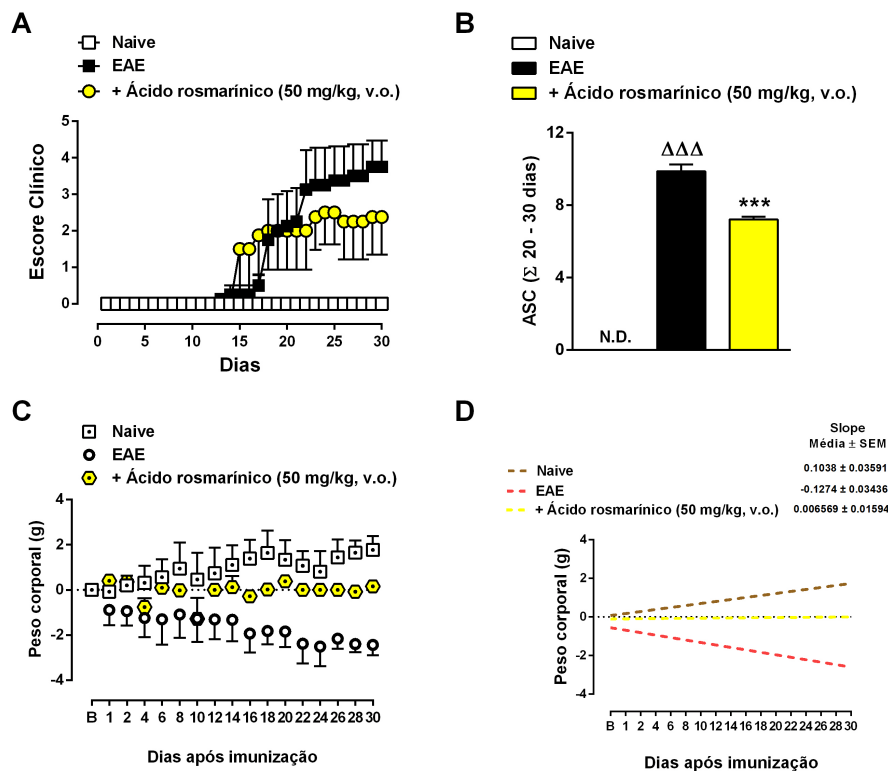


Figura 5. Tratamento preventivo com AR reduziu o surgimento dos sinais clínicos e a perda de peso induzidos pela EAE. Os animais foram imunizados com peptídeo MOG₃₅₋₅₅/CFA e com a toxina *pertussis*. Escore clínico (A) foi avaliado nos grupos naive, EAE, animais tratados com AR na dose de 50 mg/kg (v.o.) (tratamento preventivo: dia 0 – 30). Dados expressos pela área sob a curva (B) evidenciam a atividade do tratamento com AR durante o tratamento preventivo. O peso diário (C) dos animais do grupo tratamento preventivo com AR manteve-se ao longo dos dias, através da análise de regressão linear (D). Os valores representam a média \pm EPM (n=6-10 animais/grupo). $\Delta\Delta\Delta$ p<0,0001 em relação ao grupo naive; ***p< 0,0001 em relação ao grupo EAE.

Tendo em vista que os pacientes com EM necessitam de terapias mais eficazes após o surgimento e/ou desenvolvimento da doença, o próximo objetivo deste trabalho foi investigar se o tratamento terapêutico com o AR (50 mg/kg, v.o.) poderia modular os sinais clínicos, assim como a neuroinflamação induzida pela EAE. Desta forma, os animais foram devidamente tratados durante quinze dias, após o surgimento dos primeiros sinais clínicos da EAE, entre os dias 15 ao dia 30 pós-imunização, caracterizando a fase crônica da EAE. De maneira relevante, o tratamento terapêutico com AR (50 mg/kg, v.o., dia 15-30) inibiu de maneira significativa os sinais clínicos (Figura 6A e 6B) e a perda de peso (Figura 6C e 6D) induzidos pela EAE, quando comparado com o grupo EAE.

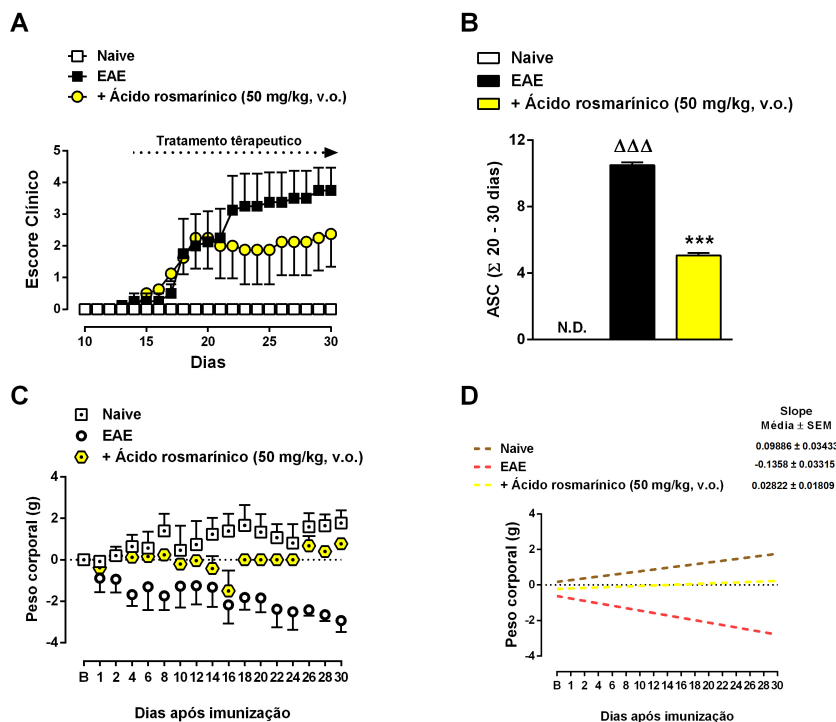


Figura 6. Tratamento terapêutico com AR reduz o surgimento dos sinais clínicos e a perda de peso induzidos pela EAE. Os animais foram imunizados com peptídeo MOG₃₅₋₅₅/CFA e com a toxina *pertussis*. Escore clínico (A) foi avaliado nos grupos naive, EAE, animais tratados com AR na dose de 50 mg/kg (v.o.) (tratamento terapêutico: dia 14 – 30). Dados expressos pela área sob a curva (B) evidenciam a atividade do tratamento com AR durante o tratamento terapêutico. O peso diário (C) dos animais do grupo tratado terapêuticamente com AR, manteve-se ao longo dos dias, mantendo-se em uma linha sem declínio, como se pode observar-se no gráfico (D). Os valores representam a média ± EPM (n=6-10 animais/grupo). $\Delta\Delta\Delta p < 0,0001$ em relação ao grupo naive; $***p < 0,0001$ em relação ao grupo EAE.

7.2. TRATAMENTO AGUDO E REPETIDO COM AR PREVINE O COMPORTAMENTO TIPO- DEPRESSIVO INDUZIDO POR LPS

Neste segundo bloco de resultados foi avaliado o efeito antidepressivo do AR no modelo de depressão induzido por LPS, através de dois protocolos: i) tratamento agudo (no qual os animais foram tratados com AR, 1 hora antes da aplicação com LPS) e ii) tratamento repetido (no qual os animais foram tratados uma vez ao dia, durante 7 dias, sendo a última dose aplicada 1 hora antes do estímulo com LPS). Nesse segundo bloco de resultados os animais foram submetidos a três testes comportamentais, sendo eles: TSC, teste de *Splash* e campo aberto. Os animais com comportamento tipo depressivos tendem a desistirem de escapar de uma situação de risco e diminuem o comportamento de auto-limpeza – *grooming*. Nesse bloco de resultados, submeteram-se os animais a duas situações: i) uma situação de perigo, na qual os animais naives

e tratados tendem a escapar (teste de suspensão pela cauda); e ii) administração de solução de sacarose no dorso, na qual avalia-se o comportamento de anedonia dos animais, através de auto-limpeza (teste de *splash*). Com o TSC pode-se observar que os animais do grupo LPS das Figuras 7A e 9A ficam imóveis mais rápido quando comparado aos animais do grupo naive – observado através do tempo de latência (Figuras 7A e 9A) – indicando assim o comportamento tipo depressivo. Em contra partida os animais do grupo tratadostiveram tempo de latência maior que os dos animais naives. Os animais tratados com AR, relevantemente, apresentam menor tempo de imobilidade (Figuras 7B e 9B). Na Figura 7B, observa-se que o AR diminuiu o tempo total de imobilidade dos animais, assim como àquele induzido pela Imipramina – controle positivo. No entanto, a quantidade de vezes que os animais ficaram imóveis durante o teste, representada nas Figuras 7C e 9C, não apresentou diferença estatística.

Com o teste de *Splash* pode-se observar que ambos os tratamentos (agudo ou repetido) com AR bloqueou o comportamento tipo depressivo. Os animais do grupo LPS levam mais tempo para realizar o movimento de *grooming* pela primeira vez quando comparado aos animais dos grupos tratados e naive (Figuras 7D e 9D). O tempo total que os animais ficaram realizando *grooming* foi estatisticamente maior nos grupos tratados quando comparado aos animais do grupo LPS (Figuras 7E e 9E). No tratamento agudo, observamos que o tempo total de *grooming* do grupo LPS foi estatisticamente menor quando comparado aos animais do grupo naive, tratado com AR e tratado com imipramina (Figura 7E). Por outro lado, o numero de vezes que os animais realizaram *grooming* não apresentou diferença estatística dentre os grupos (Figuras 7F e 9F).

Nas Figuras 8 e 10 pode-se observar que os tratamentos não induziram comprometimento motor nos animais, quando esses foram avaliados no campo aberto – número de quadrantes percorridos e número de levantamento durante 6 minutos de avaliação.

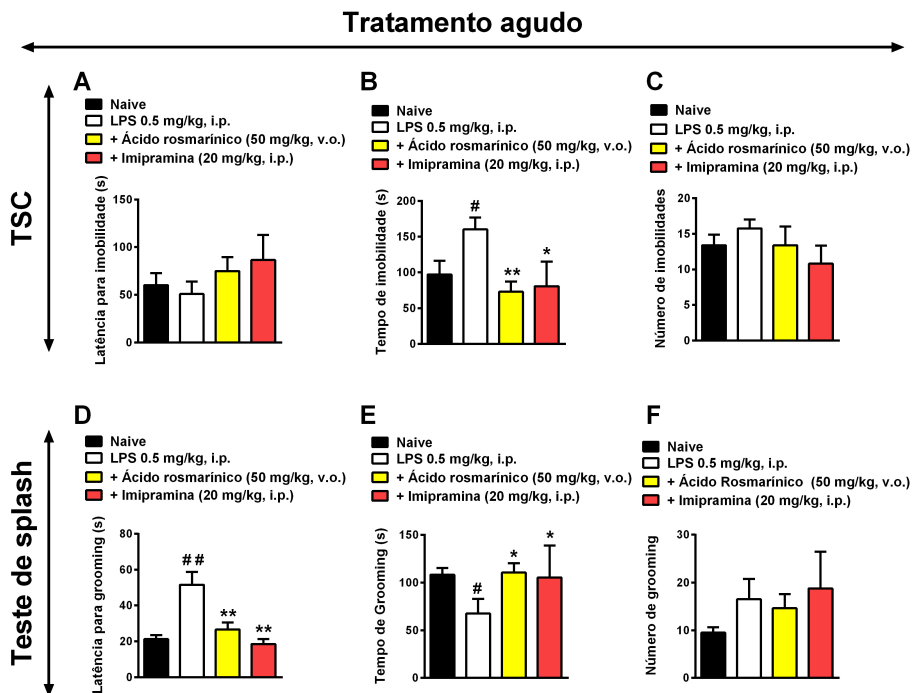


Figura 7. Tratamento agudo com AR previne os comportamentos tipo-depressivo induzido por LPS. Os animais foram imunizados com LPS (0,5mg/kg, i.p.) e submetidos ao teste de suspensão pela cauda (A, B e C) e ao teste de *Splash* (D,E e F). Na figura (A) está ilustrado o tempo de latência que os animais levaram para ficarem imóveis pela primeira vez, no TSC, dos grupos naive, LPS, AR agudo (50 mg/kg, i.p., 1 hora antes da imunização com LPS) e do grupo imipramina (20 mg/kg, i.p., 1 hora antes da imunização com LPS). O tratamento agudo com AR diminuiu o tempo total de imobilidade (B) quando comparado ao grupo LPS. O número total de imobilidade de cada grupo (C) não apresentou diferença estatística. Na figura (D) está representado o tempo de latência que os animais levaram para realizar o *grooming* pela primeira vez, nos grupos naive, LPS, AR agudo e imipramina. O tempo total de *grooming* (E) foi maior nos grupos tratados do que no grupo LPS. Já o número total de *grooming* (F) não apresentou diferença entre os grupos. Os valores representam a média \pm EPM (n=8 animais/grupo). *p<0,05 em relação ao grupo LPS; **p< 0,001 em relação ao grupo LPS; #p< 0,05 em relação ao grupo naive e ##P< 0,001 em relação ao grupo naive.

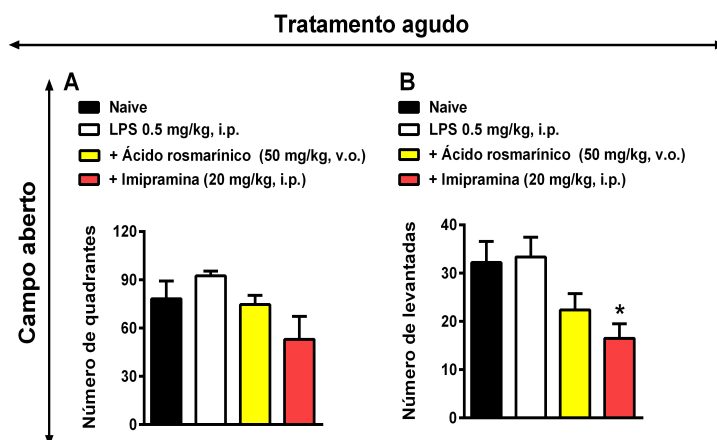


Figura 8. Tratamento agudo com AR não prejudica o comportamento locomotor e exploratório dos animais. Resultado para a tarefa de campo aberto, realizada com os grupos naive, LPS, tratamento agudo com AR e imipramina. Não houve comprometimento na quantidade de quadrantes explorados pelos animais (A) e sobre a quantidade de vezes que o

animal levantou, houve diferença estatística do grupo tratado com imipramina em relação ao grupo LPS (B). Os valores representam a média \pm EPM (n=8 animais/grupo). * p <0,05 em relação ao grupo LPS.

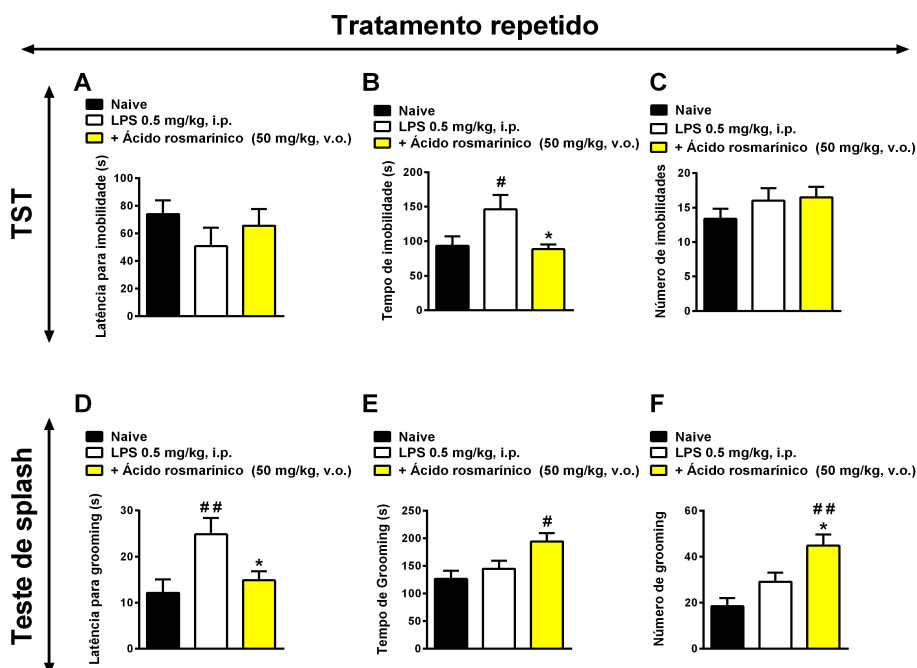


Figura 9. Tratamento repetido com AR previne os comportamentos tipo-depressivo induzido por LPS. Os animais foram imunizados com LPS (0,5mg/kg, i.p.) e submetidos ao teste de suspensão pela cauda (A, B e C) e ao teste de *Splash* (D,E e F). Na figura (A) está ilustrado o tempo de latência que os animais levaram para ficarem imóveis pela primeira vez, no TSC, dos grupos naive, LPS e AR agudo (50 mg/kg, i.p., 1 hora antes da imunização com LPS). O tratamento agudo com AR diminuiu o tempo total de imobilidade (B) quando comparado ao grupo LPS. O numero total de imobilidade de cada grupo (C) não apresentou diferença estatística. Na figura (D) está representado o tempo de latência que os animais levaram para realizar o *grooming* pela primeira vez, nos grupos naive, LPS e AR agudo. O tempo total de *grooming* (E) foi maior no grupo tratado do que nos grupos LPS e naive. Já o numero total de *grooming* (F) foi maior no grupo tratado do que no grupo LPS. Os valores representam a média \pm EPM (n=8 animais/grupo). * p <0,05 em relação ao grupo LPS; ** p < 0,001 em relação ao grupo LPS; [#] p < 0,05 em relação ao grupo naive e ^{##} P < 0,001 em relação ao grupo naive.

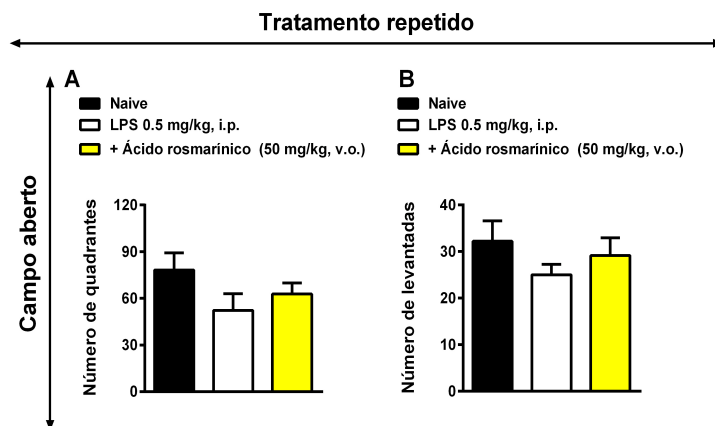


Figura 10. Tratamento repetido com AR não prejudica o comportamento locomotor e exploratório dos animais. Resultado para a tarefa de campo aberto, realizada com os grupos

Naive, LPS e tratamento repetido com AR. Não houve comprometimento na quantidade de quadrantes explorados pelos animais (A) e nem na quantidade de vezes que o animal levantou.

8. DISCUSSÃO

A busca da compreensão dos mecanismos que levam à incapacidade neurológica em pacientes portadores da EM, associado com o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas destinadas a reduzir a progressão da doença tem se destacado nas pesquisas com EM. Pacientes que desenvolvem doenças, nas quais existe a resposta neuroinflamatória, tendem a desenvolver sintomas depressivos, evento este observado em pacientes com DP, DA, EM e trauma crânio-encefálico (BRITES e FERNANDES, 2015; YIRMIYA et al., 2015; MOGHADASI et al., 2016).

A depressão é uma doença cada vez mais recorrente na população atual. Diante disso a busca por novas abordagens terapêuticas vem ganhando cada vez mais espaço na área da pesquisa. Nesse contexto, o presente estudo avaliou o potencial neuroprotetor e antidepressivo do AR, em modelo estabelecido na literatura para avaliar depressão e EM nos roedores. Nesse sentido, trabalhos prévios já demonstraram os efeitos anti-inflamatório, antioxidante, antidiabético, citoprotetor e antidepressivo do AR (AMOAHI et al., 2016; HASANEIN et al., 2016; KELSEY et al., 2010; LUAN et al., 2013; FAZEL NABAVI et al., 2015; CHU et al., 2012; PETERSON; SIMMONDS, 2003; JIANG et al., 2009; ADOMAKO-BONSU et al., 2017; MACHADO et al., 2009; SASAKI et al., 2013; TAKEDA et al., 2002; KONDO et al., 2015).

Como já explorado anteriormente, tanto a EM como a depressão, são doenças que se iniciam após uma resposta inflamatória periférica e conseqüentemente afeta o SNC, contribuindo assim para o desenvolvimento da neuroinflamação. Desse modo espera-se que substâncias com efeitos anti-inflamatórios possam modular essas doenças. Neste contexto, os resultados obtidos em nosso estudo estão em conformidade com o estudo realizado por Papa, Gomes e Rockwell (2007), os quais descrevem o efeito imunomodulador do AR, tornando-a uma substância promissora para o tratamento de doenças envolvendo a inflamação, principalmente, àquelas relacionadas ao SNC.

Nosso estudo revelou que o AR administrado preventivamente bloqueou a progressão dos sinais da EAE, além de inibir a perda de peso dos animais

durante o decurso da EAE, o que acontece comumente em animais com EAE. Assim como demonstrou que o AR administrado de forma terapêutica – no qual os animais foram tratados a partir dos primeiros sintomas clínicos da doença – inibiu de maneira significativa os sintomas clínicos e a perda de peso quando comparado aos animais do grupo EAE. Além disso, o AR administrado, de forma repetida por 7 dias consecutivos (tratamento repetido) e uma hora antes (tratamento agudo) dos testes comportamentais, inibiu o comportamento tipo depressivo em animais, tais como: reduziu o tempo de imobilidade no TSC, aumentou o tempo de *grooming* e diminuiu o tempo de latência para o primeiro *grooming* no teste do *splash*.

No estudo de Machado et al. (2009) o AR nas doses de 10 e 100mg/Kg, aplicado via oral, 1 hora antes dos testes comportamentais, em camundongos, reduziu o tempo de imobilidade dos animais tratados em relação ao grupo controle no TSC e no teste de nado forçado. Nesse estudo o AR reverteu hiperatividade, anedonia e déficit de aprendizado em modelo de depressão induzida por bubectomia olfatória, de forma similar a fluoxitina. Indo de acordo com o nosso estudo onde o AR (50mg/Kg) aplicado de forma aguda (1 hora antes dos testes comportamentais) reduziu o tempo de imobilidade dos animais tratados em comparação aos animais do grupo naive.

O estudo de Sasaki et al (2013) avaliou o efeito antidepressivo de *R. officinalis* utilizando TSC em camundongos ICR e células PC12 como modelo neuronal in vitro. Nesse estudo foi observado que os animais tratados com AR tiveram o tempo de imobilidade menos no TSC assim como no estudo de Kondo et al. (2015), que também avaliou o efeito antidepressivo do AR através do TSC. Nosso estudo também demonstrou o efeito antidepressivo do AR através da diminuição do tempo de imobilidade dos animais tratados no TSC.

A depressão é conhecida por ser acompanhada pelas respostas imunoinflamatórias, assim como na EM. Pacientes com depressão apresentam: aumento no número de leucócitos sanguíneos periféricos relacionados ao desequilíbrio linfócitos T CD4+/CD8+, além do aumento nos níveis sanguíneos de citocinas pró-inflamatórias e seus receptores, tais como IL-6 e IL-23 (VISMARI; ALVES; PALERMO- NETO, 2008). Por sua vez, a EM se inicia com a ativação e lesões mediadas por linfócitos T CD4+ e citocinas produzidas por

essas células (RIVERA-QUINONES ET AL., 1998; NEUMANN, 2003). Nossos resultados demonstraram que o AR modula tanto a depressão quanto a EM. Já foi descrito na literatura que o AR diretamente ou indiretamente inibe a migração celular e reduz a liberação de citocinas pró-inflamatórias no local da inflamação (SANTOS, 2013), propriedades estas que podem estar relacionadas com os resultados obtidos em nosso estudo. No entanto, cabe aqui ressaltar que o efeito antidepressivo do AR, foi comparado ao efeito produzido pela Imipramina – antidepressivo tricíclico comumente utilizado na prática clínica.

Sabe-se que o comportamento tipo-depressivo em animais é induzido através da aplicação do LPS, que atua como pirógeno exógeno e ativador de macrófagos, induzindo-os a liberar citocinas, tais como TNF, IL-1, IL-6, IL-8, dentre outras (TURNBULL; RIVIER, 1999). Santos (2013) descreveu que o AR inibe diretamente a produção ou liberação de citocinas pró-inflamatórias, tal como TNF. Assim, acredita-se que os efeitos induzidos pelo AR durante nossos modelos experimentais possam estar relacionados à inibição da expressão e/ou produção do TNF pelas células do sistema imune inato e/ou linfócitos Th1. Por esta razão, novos estudos serão necessários para a confirmação dessa hipótese.

Em estudos anteriores, a tratamento com o AR inibiu a resposta inflamatória no SNC através da modulação dos mediadores pró-inflamatórios, tais como a enzima COX-2 e níveis de prostaglandinas, os quais são extremamente importantes para o início e manutenção da resposta autoimune induzida durante o decurso da EM, assim como no modelo experimental de EAE (BABA et al., 2004; YOUN et al., 2003; LEE et al., 2008, SÁNCHEZ-CAMPILLO et al., 2009; ADOMAKO-BONSU et al., 2017). Assim, nossos resultados indicam que o AR, administrado preventivamente, diminuiu a progressão dos sinais da EAE, o qual poderia estar relacionado à inibição destes mediadores.

Takeda et al. (2002) descreveu que o AR aplicado na dose de 2 mg/kg, i.p., assim como o ácido cafeico aplicado na dose de 4 mg/kg, i.p., reduziram o tempo de duração da imobilidade no teste de natação forçada em camundongos, sugerindo que o AR e o ácido cafeico podem ter mecanismos

antidepressivos diferentes daqueles dos transportadores de monoaminas ou inibidores de monoamina oxidase, atualmente utilizados na prática clínica. Esses estão em acordo com os resultados obtidos no referido projeto, já que o tratamento com AR diminuiu o tempo de imobilidade no TSC, demonstrando assim sua atividade antidepressiva. Em resumo, nossos achados demonstraram que o AR reduziu os sinais clínicos da EAE, inibiu a perda de peso, assim como apresentou efeito antidepressivo em modelos animais. Contudo, ainda são necessários estudos para elucidar os mecanismos moleculares relacionados aos efeitos induzidos pelo AR.

9. CONCLUSÃO

Em resumo, nossos achados demonstraram pela primeira vez que o AR bloqueou os sinais neurológicos da EAE, através da inibição dos sinais clínicos induzidos pelo modelo. Além disso, a administração do AR por via oral inibiu o comportamento tipo-depressivo em camundongos, após inflamação periférica. Portanto, nossos dados sugerem que o AR pode constituir um possível candidato terapêutico eficaz para o tratamento da EM, bem como outras doenças neuropsiquiátricas associadas ao processo neuroinflamatório.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADOMAKO-BONSU, Amma G. et al. Antioxidant activity of rosmarinic acid and its principal metabolites in chemical and cellular systems: Importance of physico-chemical characteristics. **Toxicology In Vitro**, [s.l.], v. 40, n. 1, p.248-255, abr. 2017.

ALKAM, T. et al. A natural scavenger of peroxynitrites, rosmarinic acid, protects against impairment of memory induced by Abeta (25-35). **Behavioural Brain Research**. v. 180, p. 139-145, 2007.

ALVEL-LEON, S. V. et al. Ethnicity-dependent association of HLA DRB1-DQA1-DQB1 alleles in Brazilian multiple sclerosis patients. **Acta Neurol Scand**, v.111, p. 306–311, 2007.

AMOAHA, Solomon et al. Rosmarinic Acid – Pharmaceutical and Clinical Aspects. **Planta Medica**, [s.l.], v. 82, n. 05, p.388-406, 4 fev. 2016.

ANGST, Jules; GAMMA, Alex. Diagnosis and course of affective psychoses: was Kraepelin right?. **European Archives Of Psychiatry And Clinical Neuroscience**, [s.l.], v. 258, n. 2, p.107-110, 31 maio 2008.

ANISMAN, H et al. Cytokines as a stressor: Implications for depressive illness. *Intl. J. Neuropsychopharmacol*, v.5, p.357-373, 2002.

AYRANCI, E.; ERKAN, N. Radical scavenging capacity of methanolic Phillyrea latifolia L. extract: anthocyanin and phenolic acids composition of fruits. **Molecules**. v. 18, n. 2, p. 1798-810, 2013.

BABA, S. et al. Absorption, metabolism, degradation and urinary excretion of rosmarinic acid after intake of Perilla frutescens extract in humans. **European Journal Of Nutrition**, [s.l.], v. 44, n. 1, p.1-9, 18 fev. 2004.

BARKER, Noreen et al. Multiple sclerosis Management of multiple sclerosis in primary and secondary care. **National Clinical Guideline Centre**, Uk, v. 1, n. 1, p.1-161, jan. 2014.

BARKUS, Christopher. Genetic Mouse Models of Depression. **Behavioral Neurobiology Of Depression And Its Treatment**, [s.l.], p.55-78, 2012.

BERHOW, Mark A.; AFFUM, Andrews Obeng; GYAN, Ben A.. Rosmarinic Acid Content in Antidiabetic Aqueous Extract of Ocimum canum Sims Grown in Ghana. **Journal Of Medicinal Food**, [s.l.], v. 15, n. 7, p.611-620, jul. 2012.

BESEDOVSKY, H et al. IMMUNOREGULATORY FEEDBACK BETWEEN INTERLEUKIN-1 AND GLUCOCORTICOID HORMONES. **Science**, [s.l.], v. 233, n. 4764, p.652-654, 8 ago. 1986.

BETTELLI, Estelle et al. Loss of T-bet, But Not STAT1, Prevents the Development of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. **The Journal Of Experimental Medicine**, [s.l.], v. 200, n. 1, p.79-87, 5 jul. 2004.

BETTIO, Luis E.b. et al. Antidepressant-like effect of extract from *Polygala paniculata*: Involvement of the monoaminergic systems. **Pharmaceutical Biology**, [s.l.], v. 49, n. 12, p.1277-1285, 12 nov. 2011.

BRITES, D.; FERNANDES, A. Neuroinflammation and Depression: Microglia Activation, Extracellular Microvesicles and microRNA Dysregulation. **Frontiers in cellular neuroscience**, v. 9, p. 476-496, 2015.

BRUCKLACHER-WALDERT, V. *et al.* . Phenotypical and functional characterization of T helper 17 cells in multiple sclerosis. **Brain : a journal of neurology**, v. 132, n. Pt 12, p. 3329-41, 2009.

BUDZYNSKA, B. et al. . Effects of imperatorin on nicotine-induced anxiety- and memory-related responses and oxidative stress in mice. **Physiol Behav**, 2013.

CABREIRA, Lysa Melina Barros; CECCBINI, Alessandra Lourenço. Imunopatologia da esclerose múltipla. **Biosaúde**, Londrina, v. 8, n. 2, p.125-144, dez. 2006.

CHASTAIN, Emily M.I. et al. The role of antigen presenting cells in multiple sclerosis. **Biochimica Et Biophysica Acta (bba) - Molecular Basis Of Disease**, U.s.a., v. 1812, n. 2, p.265-274, fev. 2011.

CHOI, H. R. et al. Peroxynitrite scavenging activity of herb extracts. **Phytotherapy Research**. v. 16, p. 364-367, 2002.

CHU, X. et al. Effects of a Natural Prolyl Oligopeptidase Inhibitor, Rosmarinic Acid, on Lipopolysaccharide-Induced Acute Lung Injury in Mice. **Molecules**. v. 17, p. 3586-3598, 2012.

COLLA, André R.s. et al. Involvement of monoaminergic systems in the antidepressant-like effect of *Eugenia brasiliensis* Lam. (Myrtaceae) in the tail suspension test in mice. **Journal Of Ethnopharmacology**, [s.l.], v. 143, n. 2, p.720-731, set. 2012.

COLLA, André Roberto da Silva. **Efeito tipo-antidepressivo e tipo-ansiolítico do ácido ursólico em camundongos em diferentes modelos animais**. 2015. 168 f. Tese (Doutorado) - Curso de Neurociências, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2015.

CONNOR, T. J. et al. An assessment of the effects of central interleukin-1 β , -2, -6, and tumor necrosis factor- α administration on some behavioural, neurochemical, endocrine and immune parameters in the rat. **Neuroscience**, v. 84, p. 923-933, 1998

CONSTANTINESCU, Cris S et al. Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) as a model for multiple sclerosis (MS). **British Journal Of Pharmacology**, [s.l.], v. 164, n. 4, p.1079-1106, out. 2011.

CRUZ-MACHADO, Sanseray da Silveira. Lipopolissacarídeo (LPS): ativador e regulador da transcrição gênica via fator de transcrição NFkB. **Revista da Biologia**, [s.l.], v. 4, p.40-43, jun. 2010.

CRYAN, John F.; MOMBÉREAU, Cedric; VASSOUT, Annick. The tail suspension test as a model for assessing antidepressant activity: Review of pharmacological and genetic studies in mice. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, [s.l.], v. 29, n. 4-5, p.571-625, jan. 2005.

DANTZER, R. Cytokine-induced sickness behavior: mechanisms and implications. *Ann. N Y Acad. Sci.*, v. 933, p. 222–234, 2001. DANTZER, R. **Psychoneuroimmunology**. Amsterdam: Elsevier, 2007.

DANTZER, R.; BLUTHE, R. M.; CASTANON, N.; CHAUVET, N.; CAPURON, L.; GOODALL, G.; KELLEY, K. W. **Psychoneuroimmunology**. San Diego, CA: Academic Press, 2001.

DANTZER, R.; O'CONNOR, J.C.; FREUND, G.G.; JOHNSON, R.W.; KELLEY, K.W. From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain. *Nat. Rev. Neurosci.*, v. 9, p. 46–56, 2008.

DO OLIVAL, G. S. et al. . Genomic analysis of ERVWE2 locus in patients with multiple sclerosis: absence of genetic association but potential role of human endogenous retrovirus type W elements in molecular mimicry with myelin antigen. **Front Microbiol**, v. 4, p. 172, 2013.

DOBOSZEWSKA, Urszula et al. Zinc in the Monoaminergic Theory of Depression: Its Relationship to Neural Plasticity. **Neural Plasticity**, v. 2017, p.1-18, 24 jan. 2017.

DOUVARAS, Panagiotis et al. Efficient Generation of Myelinating Oligodendrocytes from Primary Progressive Multiple Sclerosis Patients by Induced Pluripotent Stem Cells. **Stem Cell Reports**, [s.l.], v. 3, n. 2, p.250-259, ago. 2014.

DUNN, A. J. Cytokine activation of the HPA axis. *Ann. NY Acad. Sci.*, v. 917, p. 608–617, 2000.

DUNN, A. J. Effects of cytokines and infections on brain neurochemistry. **Clin. Neurosci. Res.**, v. 6, p. 52–68, 2006.

DUNN, A. J. Systemic interleukin-1 administration stimulates hypothalamic norepinephrine metabolism paralleling the increased plasma corticosterone. **Life Sci.**, v. 43, p. 429–435, 1999.

DUNN, A.J.; SWIERGIEL, A.H. Effects of interleukin-1 and endotoxin in the forced swim and tail suspension tests in mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, v. 81, p. 688–693, 2005.

DUTRA RC et al. **Avaliação do receptors B1 e B2 para as cininas na modulação da encefalomielite autoimune experimental**. Tese (doutorado) – Universidade Federal de Santa Catarina. Centro de ciências biológicas. Programa de pós-graduação em Farmacologia. 2012.

EBERS, G. C. et al. A population based study of multiple sclerosis in twins. **N Engl J Med**, n. 315, p. 1638-1642, 1986.

EBMEIER, K. P.; DONAGHEY, C.; STEELE, J. D. Recent developments and current controversies in depression. **Lancet**, v. 367, n. 9505, p. 153-67, 2006.

ECKELI, A.L., Dach, F., Rodrigues, A.L.S. Acute treatments with GMP produce antidepressant-like effects in mice. **NeuroReport**, v. 11, p. 839-843, 2000.

ERRANTE, Paolo Ruggero; FERRAZ, Renato Ribeiro Nogueira; RODRIGUES, Francisco Sandro Menezes. **ESCLEROSE MÚLTIPLA: TRATAMENTO FARMACOLÓGICO E REVISÃO DE LITERATURA**. **Unilus Ensino e Pesquisa**, São Paulo, v. 13, n. 30, p.105-117, jan. 2016.

ERTAS, Abduselam et al. A detailed study on the chemical and biological profiles of essential oil and methanol extract of *Thymus nummularius* (Anzer tea): Rosmarinic acid. **Industrial Crops And Products**, [s.l.], v. 67, n. 1, p.336-345, maio 2015.

ESMAEL, Ahmed; EL-SHERIF, Mohammed; ELAZZOUNY, Aymana. Effects of vitamin D deficiency on the relapse, severity, and disability of multiple sclerosis. **The Egyptian Journal Of Neurology, Psychiatry And Neurosurgery**, [s.l.], v. 53, n. 3, p.174-178, jun. 2016.

FAIRCHILD, K. D. et al. Endotoxin depresses heart rate variability in mice: cytokine and steroid effects. **Ajp: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, [s.l.], v. 297, n. 4, p.1019-1027, 5 ago. 2009.

FALLARINI, S., et al. Clovamide and rosmarinic acid induce neuroprotective effects in in vitro models of neuronal death. **British Journal of Pharmacology**. v. 157, n. 6, p. 1072-84, 2009.

FARINA, Cinthia et al. Preferential expression and function of Toll-like receptor 3 in human astrocytes. **Journal Of Neuroimmunology**, Germany, v. 159, n. 1-2, p.12-19, fev. 2005.

FAZEL NABAVI, S., Carlo Tenore, G., Daglia, M., Tundis, R., Rosa Loizzo, M., Mohammad Nabavi, S. The cellular protective effects of rosmarinic acid: from bench to bedside. **Current neurovascular research**, v.12, n.1, p. 98-105, 2015.

FERRARI, F.; VILLA, R. F.. The Neurobiology of Depression: an Integrated Overview from Biological Theories to Clinical Evidence. **Molecular Neurobiology**, [s.l.], 10 ago. 2016.

FERRARI, F.; VILLA, R. F.. The Neurobiology of Depression: an Integrated Overview from Biological Theories to Clinical Evidence. **Molecular Neurobiology**, 10 ago. 2016.

FINKELSZTEJN, Alessandro et al. Clinical features of multiple sclerosis in the south of Brazil: a partial analysis. **Arquivos de Neuro-psiquiatria**, [s.l.], v. 67, n. 4, p.1071-1075, dez. 2009.

FROHMAN, Elliot M.; RACKE, Michael K.; RAINE, Cedric S.. Multiple Sclerosis — The Plaque and Its Pathogenesis. **New England Journal Of Medicine**, [s.l.], v. 354, n. 9, p.942-955, 2 mar. 2006.

GABY, Alan. Multiple Sclerosis. **Global Advances In Health And Medicine**, [s.l.], v. 2, n. 1, p.50-56, jan. 2013.

GANGULY, D. *et al.* . The role of dendritic cells in autoimmunity. **Nature reviews. Immunology**, v. 13, n. 8, p. 566-77, 2013.

GAO, L. P.; WEI, H. L.; ZHAO, H. S.; XIAO, S. Y.; ZHENG, R. L.; Antiapoptotic and antioxidant effects of rosmarinic acid in astrocytes. **Pharmazie**. v. 60, n. 1, p. 62-65, 2005.

GARG, N.; SMITH, T. W. An update on immunopathogenesis, diagnosis, and treatment of multiple sclerosis. **Brain and Behavior**, Massachusetts, v. 10, p. 1-13, 2015.

GHAFFARI, Hadi et al. Rosmarinic acid mediated neuroprotective effects against H₂O₂-induced neuronal cell damage in N2A cells. **Life Sciences**, [s.l.], v. 113, n. 1-2, p.7-13, set. 2014.

GOEL, Nirupa; INNALA, Leyla; VIAU, Victor. Sex differences in serotonin (5-HT) 1A receptor regulation of HPA axis and dorsal raphe responses to acute restraint. **Psychoneuroendocrinology**, [s.l.], v. 40, p.232-241, fev. 2014.

GOLDENBERG, Marvin M.. Multiple Sclerosis Review. **P&t**, [s.l.], v. 37, n. 3, p.175-184, mar. 2012.

GOVERMAN, Joan. Autoimmune T cell responses in the central nervous system. **Nature Reviews Immunology**, Usa, v. 9, n. 6, p.393-407, jun. 2009.

GOVINDARAJ, Jayanthi; PILLAI, Subramanian Sorimuthu. Rosmarinic acid modulates the antioxidant status and protects pancreatic tissues from glucolipotoxicity mediated oxidative stress in high-fat diet: streptozotocin-induced diabetic rats. **Molecular And Cellular Biochemistry**, [s.l.], v. 404, n. 1-2, p.143-159, 4 mar. 2015.

GROSSO, Clara; VALENTÃO, Patrícia; ANDRADE, Paula B.. Depressive Disorders: Prevalence, Costs, and Theories. **Herbal Medicine In Depression**, [s.l.], p.1-41, 2016.

GUGINSKI, G. et al. Mechanisms involved in the antinociception caused by ethanolic extract obtained from the leaves of *Melissa officinalis* (lemon balm) in mice. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v.93, n.1, p. 10-16, 2009.

GÜLÇİN, İlhami et al. Rosmarinic acid inhibits some metabolic enzymes including glutathione S-transferase, lactoperoxidase, acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase and carbonic anhydrase isoenzymes. **Journal Of Enzyme Inhibition And Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 31, n. 6, p.1698-1702, 10 fev. 2016.

GULYAEVA, N. V.. Interplay between brain BDNF and glutamatergic systems: A brief state of the evidence and association with the pathogenesis of depression. **Biochemistry (moscow)**, [s.l.], v. 82, n. 3, p.301-307, mar. 2017.

HART, B.L. Biological basis of the behavior of sick animals. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, v. 12, p.123–137, 1988.

HASANEIN, P. et al. Rosmarinic acid protects against chronic ethanol-induced learning and memory deficits in rats. **Nutritional Neuroscience**, p.1-8, 2016.

HIRSCHFELD, R.M.A. History and evolution of the monoamine hypothesis of depression. **Journal of Clinical Psychiatry**, v.61, p.4-6, 2010

HOFSTETTER, H. H.; SHIVE, C. L.; FORSTHUBER, T. G.. Pertussis Toxin Modulates the Immune Response to Neuroantigens Injected in Incomplete Freund's Adjuvant: Induction of Th1 Cells and Experimental Autoimmune Encephalomyelitis in the Presence of High Frequencies of Th2 Cells. **The Journal Of Immunology**, [s.l.], v. 169, n. 1, p.117-125, 1 jul. 2002

HOOKER, C. W.; LOTT, W. B.; HARRICH, D. Inhibitors of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase target distinct phases of early reverse transcription. **Journal of Virology**. v. 75, p. 3095–3104, 2001.

HORNG, Sam; FABIAN, Michelle. The Pathophysiology and Clinical Presentation of Multiple Sclerosis. **Handbook Of Relapsing-remitting Multiple Sclerosis**, [s.l.], p.17-40, 2017. Springer International Publishing.

JAYANTHY, G.; SUBRAMANIAN, S.. Rosmarinic acid, a polyphenol, ameliorates hyperglycemia by regulating the key enzymes of carbohydrate metabolism in high fat diet – STZ induced experimental diabetes mellitus. **Biomedicine & Preventive Nutrition**, [s.l.], v. 4, n. 3, p.431-437, jul. 2014.

JIANG, W.L. et al. Rosmarinic acid protects against experimental sepsis by inhibiting pro inflammatory factor release and ameliorating hemodynamics. **Shock**. v. 32, p. 608-613, 2009.

JURUENA, Mario F; CLEARE, Anthony J; PARIANTE, Carmine M. O eixo hipotálamo-pituitária-adrenal, a função dos receptores de glicocorticóides e sua importância na depressão. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, [s.l.], v. 26, n. 3, p.189-201, set. 2004

KAIMEN-MACIEL, D. R. et al. HLA-DRB1 * allele-associated genetic susceptibility and protection against multiple sclerosis in Brazilian patients. **Mol Med Rep**, v. 2, p. 993-998, 2009.

KALUEFF, A. V.; JENSEN, C. L.; MURPHY, D. L. Locomotory patterns, spatiotemporal organization of exploration and spatial memory in serotonin transporter knockout mice. **Brain Res**, v. 1169, p. 87-97, 2007.

KALUEFF, Allan V. et al. Neurobiology of rodent self-grooming and its value for translational neuroscience. **Nature Reviews Neuroscience**, [s.l.], v. 17, n. 1, p.45-59, 17 dez. 2015.

KARACA, Yeliz et al. The Differential Diagnosis of Multiple Sclerosis Using Convex Combination of Infinite Kernels. **Cns & Neurological Disorders - Drug Targets**, [s.l.], v. 16, n. 1, p.36-43, 11 jan. 2017.

KARTHIK, Dhanapalan; VISWANATHAN, Periyasami; ANURADHA, Carani Venkatraman. Administration of Rosmarinic Acid Reduces Cardiopathology and Blood Pressure Through Inhibition of p22phox NADPH Oxidase in Fructose-Fed Hypertensive Rats. **Journal Of Cardiovascular Pharmacology**, [s.l.], v. 58, n. 5, p.514-521, nov. 2011.

KELSEY, N. A. et al. Nutraceutical antioxidants as novel neuroprotective agents. **Molecules**, v.15, n.11, p.7792-7814, 2010.

KENT, S.; BLUTHE, R. M.; KELLEY, K.W.; DANTZER, R. Sickness behavior as a new target for drug development. **Trends Pharmacol. Sci.**, v. 13, p. 24–28, 1992.

KIM, Gun-dong et al. Production and applications of rosmarinic acid and structurally related compounds. **Applied Microbiology And Biotechnology**, [s.l.], v. 99, n. 5, p.2083-2092, 27 jan. 2015.

KIM, Jeong Hun et al. Rosmarinic acid suppresses retinal neovascularization via cell cycle arrest with increase of p21WAF1 expression. **European Journal Of Pharmacology**, [s.l.], v. 615, n. 1-3, p.150-154, ago. 2009.

KOMES, D., et al. Phenolic composition and antioxidant properties of some traditionally used medicinal plants affected by the extraction time and hydrolysis. **Phytochemical Analysis**. v. 22, n. 2, p. 172-80, 2011.

KONDO, Shinji et al. Antidepressant-like effects of rosmarinic acid through mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 and brain-derived neurotrophic factor modulation. **Journal Of Functional Foods**, [s.l.], v. 14, n. 1, p.758-766, abr. 2015.

KONSMAN, J.P.; PARNET, P.; DANTZER, R. Cytokine-induced sickness behaviour: mechanisms and implications. **Trends Neurosci.**, v. 25, p. 154–159, 2002.

KRISHNAN, Vaishnav; NESTLER, Eric J.. Animal Models of Depression: Molecular Perspectives. **Molecular And Functional Models In Neuropsychiatry**, v. 7, p.121-147, 2011.

KRUMBHOLZ, M. *et al.* . B cells and antibodies in multiple sclerosis pathogenesis and therapy. **Nature reviews. Neurology**, v. 8, n. 11, p. 613-23, 2012.

KU, Sae-kwang et al. Rosmarinic acid down-regulates endothelial protein C receptor shedding in vitro and in vivo. *Food And Chemical Toxicology*, [s.l.], v. 59, p.311-315, set. 2013.

LACOSTA, S.; MERALI, S.; ANISMAN, H. Behavioral and neurochemical consequences of lipopolysaccharide in mice: anxiogenic-like effects. **Brain Res.**, v. 818, p. 291–303, 1999.

LANGHANS, W. Bacterial products and the control of ingestive behavior: clinical implications. **Nutrition**, v. 12, p. 303–315, 1996.

LAPMANEE, S.; CHAROENPHANDHU, J.; CHAROENPHANDHU, N. Beneficial effects of fluoxetine, reboxetine, venlafaxine, and voluntary running exercise in stressed male rats with anxiety- and depression-like behaviors. **Behav Brain Res**, v. 250, p. 316-25, 2013.

LEE, H. J. et al. Rosmarinic acid protects human dopaminergic neuronal cells against hydrogen peroxide-induced apoptosis. **Toxicology**. v. 250, p. 109-115, 2008.

LINK, Hans; XIAO, Bao-guo. Rat models as tool to develop new immunotherapies. **Immunological Reviews**, [s.l.], v. 184, n. 1, p.117-128, dez. 2001.

LINTHORT, A.C.; REUL, J. M. Brain neurotransmission during peripheral inflammation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, v. 840, p. 139–152, 1998.

LOMA, Ingrid; HEYMAN, Rock. Multiple Sclerosis: Pathogenesis and Treatment. **Current Neuropharmacology**, [s.l.], v. 9, n. 3, p.409-416, 1 set. 2011.

LUAN, H. et al. Rosmarinic acid protects against experimental diabetes with cerebral ischemia: relation to inflammation response. **Journal of Neuroinflammation**. v. 10, p. 1-10, 2013.

MACHADO, D.g. et al. Antidepressant-like effect of ursolic acid isolated from *Rosmarinus officinalis* L. in mice: Evidence for the involvement of the

dopaminergic system. *Pharmacology Biochemistry And Behavior*, [s.l.], v. 103, n. 2, p.204-211, dez. 2012.

MACHADO, Daniele G. et al. Antidepressant-like effect of the extract of *Rosmarinus officinalis* in mice: Involvement of the monoaminergic system. **Progress In Neuro-psychopharmacology And Biological Psychiatry**, [s.l.], v. 33, n. 4, p.642-650, jun. 2009.

MAES, M. A review on the acute phase response in major depression. **Rev. Neurosci.**, v. 4, n. 4, p. 407–416, 1993.

MAES, M., D'Haese, P.C., Scharpe, S., D'Hondt, P., Cosyns, P., De Broe, M.E. Hypozincemia in depression. *J. Affect. Disord.*, v. 31, p. 135-140, 1994.

MAES, M.; SONG, C.; YIRMIYA, R. Targeting Il-1 in Depression. *Expert Opin. Ther. Targets*, v. 27, p. 27, 2012

MAMELI, G. *et al.* . Epstein-Barr virus and *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* peptides are cross recognized by anti-myelin basic protein antibodies in multiple sclerosis patients. **Journal of neuroimmunology**, v. 270, n. 1-2, p. 51-5, 2014.

MANTOVANI, M. et al. Melatonin exerts an antidepressant-like effect in the tail suspension test in mice: evidence for involvement of N-methyl-D-aspartate receptors and the L-arginine-nitric oxide pathway. **Neurosci. Lett.**, v. 343, p. 1-4, 2003.

MARTIN-DE-SAAVEDRA, M. D. *et al.* . Nrf2 participates in depressive disorders through an anti-inflammatory mechanism. **Psychoneuroendocrinology**, v. 38, n. 10, p. 2010-2022, 2013.

MAŠKOVIĆ, P. et al. Phenolic compounds and biological activity of *Kitaibelia vitifolia*. **Journal of Medical Food**. v. 14, n. 12, p. 1617-23, 2011.

MATHEW, S. J. et al. Glutamate modulators as novel interventions for mood disorders. **Revista brasileira de psiquiatria**, v. 27, n. 3, p. 243–248, set. 2005.

MCARTHUR, R.; BORSINI, F. Animal models of depression in drug discovery: a historical perspective. **Pharmacology, biochemistry, and behavior**, v. 84, n. 3, p. 436–452, jul. 2006.

MCFARLAND, H. F.; MARTIN, R. Multiple sclerosis: a complicated picture of autoimmunity. **Nat Immunol**, v. 8, n. 9, p. 913-9, 2007.

MCQUADE R, YOUNG AH. Future therapeutic targets in mood disorders: the glucocorticoid receptor. **Br J Psychiatry**, v.177, p.390–395, 2000.

MENDEL, Itzhack; ROSBO, Nicole Kerlero de; BEN-NUN, Avraham. A myelin oligodendrocyte glycoprotein peptide induces typical chronic experimental autoimmune encephalomyelitis in H-2b mice: Fine specificity and T cell receptor

V β expression of encephalitogenic T cells. **European Journal Of Immunology**, [s.l.], v. 25, n. 7, p.1951-1959, jul. 1995. Wiley-Blackwell.

MENDES, Maria Fernanda et al. Depressão na esclerose múltipla forma remitente-recorrente. *Arquivos de Neuro-psiquiatria*, [s.l.], v. 61, n. 3, p.591-595, set. 2003.

MILLAN, M. J. The neurobiology and control of anxious states. **Prog. Neurobiol.**, v. 70, p. 83–244, 2003.

MINICUCCI, Fernanda Chiuso. **Efeito da infecção com *Strongyloides venezuelensis* no desenvolvimento da encefalite autoimune experimental (EAE)**. 2010. 92 f. Tese (Doutorado) - Curso de Doenças Tropicais, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu – Sp, 2010.

MOGHADASI, Abdorreza Naser et al. Behavioral Neurology of Multiple Sclerosis and Autoimmune Encephalopathies. **Neurologic Clinics**, [s.l.], v. 34, n. 1, p.17-31, fev. 2016.

MOON, Dong-oh et al. Rosmarinic acid sensitizes cell death through suppression of TNF- α -induced NF- κ B activation and ROS generation in human leukemia U937 cells. *Cancer Letters*, [s.l.], v. 288, n. 2, p.183-191, fev. 2010.

MOREIRA, Marcos Aurélio et al. ESCLEROSE MÚLTIPLA: ESTUDO DESCRITIVO DE SUAS FORMAS CLÍNICAS EM 302 CASOS. **Arq Neuropsiquiatr**, São Paulo, v. 58, n. 2-, p.460-466, 2000.

NA, L. *et al.* Effects of the total flavonoid extract of Xiaobuxin-Tang on depression-like behavior induced by lipopolysaccharide and proinflammatory cytolike levels in mice. **J. Ethnopharmacol.**, v. 163, p. 83-87, 2015

NEMEROFF, C. B.; OWENS, M. J. Treatment of mood disorders. **Nat Neurosci**, v. 5 Suppl, p. 1068-70, 2002.

O’CONNOR, Richard A. et al. Cutting Edge: Th1 Cells Facilitate the Entry of Th17 Cells to the Central Nervous System during Experimental Autoimmune Encephalomyelitis 1. **J Immunol**, U.K., v. 6 n. 181, p.3750-3754, 15 set. 2008.

OLIVEIRA, Enedina Maria Lobato de; SOUZA, Nilton Amorim de. Esclerose Múltipla. **Rev. Neurociências**, São Paulo, v. 6, n. 3, p.114-118, jan. 1998.

ONTANEDA, Daniel et al. Progressive multiple sclerosis: prospects for disease therapy, repair, and restoration of function. **The Lancet**, [s.l.], v. 389, n. 10076, p.1357-1366, abr. 2017.

Organização Mundial da Saúde. (2001). *The World Health Report– Mental Health: New Understanding. New Hope.*

OU, Juanying et al. Effect of rosmarinic acid and carnosic acid on AGEs formation in vitro. **Food Chemistry**, [s.l.], v. 221, n. 1, p.1057-1061, abr. 2017.

PANITCH HS, Hirsch RL, Haley AS, Johnson KP. Exacerbations of multiple sclerosis in patients treated with gamma interferon. **Lancet**, London, England, v. 1, n. 8538, p.893-895, 1987

PAPA, L.; GOMES, E.; ROCKWELL, P. Reactive oxygen species induced by proteasome inhibition in neuronal cells mediate mitochondrial dysfunction and a caspase-independent cell death. **Apoptosis**. v. 12, n. 8, p. 1389-405, 2007.

PELLOW, S.; CHOPIN, P.; FILE, S. E.; BRILEY, M. Validation of open : closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *The Journal of Neuroscience Methods*. 14: 149-167, 1985.

PEREIRA, P. et al. Neurobehavioral and genotoxic aspects of rosmarinic acid. **Pharmacology Research**. v. 52, n. 3, p. 199-203, 2005.

PETERSON, M.; SIMMONDS, M. S. J. Rosmarinic acid. **Phytochemistry**.v. 62, p. 121–125, 2003.

PORSOLT, R.D. et al. Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. **Arch. Int. Pharm. Ther.**, v. 229, p. 327–336, 1977.

QIAO, S. et al. Rosmarinic acid inhibits the formation of reactive oxygen and nitrogen species in RAW264.7 macrophages. **Free Radicals Research**. v. 39, p. 995-1003, 2005.

RACKE, Michael K.; HU, Wei; LOVETT-RACKE, Amy E.. PTX cruiser: driving autoimmunity via TLR4. **Trends In Immunology**, Usa, v. 26, n. 6, p.289-291, jun. 2005. Elsevier BV.

RAETZ, C.R.; WHITFIELD, C. Lipopolysaccharide endotoxins. *Annu. Rev. Biochem.*, v. 71, p. 635-700, 2002.

Rang, H.P. et al. *Farmacologia*. 8^a ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2016.

REN, P. et al. Rosmarinic acid inhibits 6-OHDA-induced neurotoxicity by anti-oxidation in MES23.5 cells. **Journal of Molecular Neuroscience**. v. 39, p. 220–225, 2009.

RIETSCHEL, E.T. et al. Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function. **Faseb J.**, v. 8, p. 217-225, 1994.

RIVERS, T.M., SPRUNT, D.H., BERRY, G.P. Observations on attempts to produce acute disseminated encephalomyelitis in monkeys. **The Journal of Experimental Medicine**, n. 58, p. 39- 53, 1933

RODGERS, R. J.; DALVI, A. Anxiety, defence and the elevated plusmaze. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 21, n. 6, p. 801-10, 1997.

RODRIGUES, A. L. et al. . Effect of perinatal lead exposure on rat behaviour in open-field and two-way avoidance tasks. **Pharmacol Toxicol**, v. 79, n. 3, p. 150-6, 1996.

ROJAS, O. L. et al. HLA class II polymorphism in Latin American patients with multiple sclerosis. **Autoimmun Rev.**, n. 9, p. 407–413, 2010.

ROY, D.; MUKHOPADHYAY, S. Enhanced rosmarinic acid production in cultured plants of two species of *Mentha*. **Indian Journal of Experimental Biology**. v. 50, n. 11, p. 817-25, 2012.

SANTOS, Ubirajara Duarte dos. **AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTINOCICEPTIVO E ANTIINFLAMATÓRIO DO ÁCIDO ROSMARÍNICO**. 2013. 110 f. Tese (Doutorado) - Curso de Programa de Pósgraduação em Neurociências, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2013.

SALIN, O. P., et al. Effects of coadministration of natural polyphenols with doxycycline or calcium modulators on acute *Chlamydia pneumoniae* infection in vitro. *Journal of Antibiotics*. v.64, n. 11, p. 747-52, 2011.

SALTAS, D. et al. Determination of Rosmarinic Acid in Lamiaceae Herbs Using Diffuse Reflectance Infrared Fourier Transform Spectroscopy (DRIFTS) and Chemometrics. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 61, n. 13, p. 3235-41, 2013.

SARTORIUS, N. The economic and social burden of depression. **J. Clin. Psychiatry**, v. 62, Suppl. 15, p. 8–11, 2001.

SASAKI, Kazunori et al. Rosmarinus officinalis polyphenols produce antidepressant like effect through monoaminergic and cholinergic functions modulation. **Behavioural Brain Research**, [s.l.], v. 238, n. 1, p.86-94, fev. 2013.

SCARPATI, M. L.; ORIENTE, G. Isolamento e constituição dell'acido rosmarinico (dal rosmarinus off.). **Ricerca Science**. v. 28, p. 2329–2333, 1958.

SCHMIDT, H; WILLIAMSON, D; ASHLEY-KOCH, A. HLA-DR15 Haplotype and Multiple Sclerosis: A HuGE Review. **Am J Epidemiol**, v. 165, n. 10, 2007.

SHIMOJO, Y. et al. Effect of rosmarinic acid in motor dysfunction and life span in a mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis. **Journal of Neuroscience Research**. v. 88, p. 896-904, 2010.

SILVA, Adriana Karla Gávio; PAULA, Márcio Luiz de; FERREIRA, Ana Paula. Imunopatologia da encefalomielite auto-imune experimental murina mediada por linfócitos T. **Hu Revista**, Juiz de Fora, v. 34, n. 3, p.205-212, jan.-fev. 2008.

SILVA, Décio Fragata da; NASCIMENTO, Valdete Mota Silva do. ESCLEROSE MÚLTIPLA: IMUNOPATOLOGIA, DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO: ARTIGO

DE REVISÃO. **Interfaces Científicas: Saúde e Ambiente**, Aracaju, v. 2, n. 3, p.81-90, jun. 2014.

SILVA, Luan Crístian da. **Efeito do derivado antraquinônico 1-metoxi-4-[(2-hidroxitetradecil)amino]-antraceno-9, 10-diona (MTA), análogo a mitoxandrona, na modulação da resposta imune em modelos de encefalomielite autoimune experimental**. 2015. 88 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2015

SIQUEIRA, Mirian Krystel; PIRES, Liliane. Processo epigenéticos envolvidos na fisiopatologia da esclerose múltipla com ênfase na função dos miRNAs. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, [s.l.], v. 37, n. 2, p.125-136, 26 dez. 2016.

SMITH, R. S. The macrophage theory of depression. **Med. Hypotheses**, v. 35, p. 298– 306, 1991.

SOSPEDRA, Mireia; MARTIN, Roland. IMMUNOLOGY OF MULTIPLE SCLEROSIS. **Annual Review Of Immunology**, Maryland, v. 23, n. 1, p.683-747, abr. 2005. Annual Reviews.

SOTNIKOVA, Ruzena et al. Rosmarinic acid administration attenuates diabetes-induced vascular dysfunction of the rat aorta. **Journal Of Pharmacy And Pharmacology**, [s.l.], v. 65, n. 5, p.713-723, 27 fev. 2013. Wiley-Blackwell.

STASHENKO, E. E. et al. Chromatographic and mass spectrometric characterization of essential oils and extracts from Lippia (Verbenaceae) aromatic plants. **Journal of Separation Science**. v. 36, n. 1, p. 192-202, 2013.

STERU, L et al. The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. **Psychopharmacology (berl)**, [s.l.], v. 85, n. 3, p.367-370, 1985.

STROMNES, Ingunn M; GOVERMAN, Joan M. Active induction of experimental allergic encephalomyelitis. **Nature Protocols**, Washington, v. 1, n. 4, p.1810-1819, nov. 2006. Springer Nature.

TAKEDA, Hiroshi et al. Rosmarinic acid and caffeic acid produce antidepressive-like effect in the forced swimming test in mice. **European Journal Of Pharmacology**, [s.l.], v. 449, n. 3, p.261-267, ago. 2002.

TAKEDA, Hiroshi et al. Rosmarinic acid and caffeic acid produce antidepressive-like effect in the forced swimming test in mice. **European Journal Of Pharmacology**, [s.l.], v. 449, n. 3, p.261-267, ago. 2002.

TEWTRAKUL S. et al. HIV-1 integrase inhibitory substances from *Coleus parvifolius*. **Phytotherapy Research**. v. 17, n. 3, p. 232-9, 2003.

TIERNEY, J. G. Treatment-resistant depression: managed care considerations. **Journal of Managed Care Pharmacy**, v. 13, n. 6 Suppl A, p. S2–7, jul. 2007.

TUIN, A. et al. On the role and fate of LPS-dephosphorylating activity in the rat liver. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, v. 290, p. 377-385, 2006.

TURNBULL, A.V.; RIVIER, C. L. Regulation of the hypothalamic–pituitary–adrenal axis by cytokines: actions and mechanisms of action. *Physiol. Rev.*, v. 79, p. 1–71, 1999.

VARGHESE BAFP, Brown ES. The hypothalamic-pituitary-adrenal axis in major depressive disorder: a brief primer for primary care physicians. *Prim Care Companion J Clin Psychiatry*. v.3 n.4, p.151–155, 2000-2001

VISMARI, Luciana; ALVES, Glauce Jussilane; PALERMO-NETO, João. Depressão, antidepressivos e sistema imune: um novo olhar sobre um velho problema. *Rev Psiq Clín*, São Paulo, v. 35, n. 5, p.196-204, 14 maio 2008.

WANG, J. et al. Neurorescue effect of rosmarinic acid on 6hydroxydopamine-lesioned nigral dopamine neurons in rat model of Parkinson's disease. *Journal of Molecular Neuroscience*. v. 47, n. 1, p. 113-9, 2012.

WEISSERT, Robert. The Immune Pathogenesis of Multiple Sclerosis. *Journal Of Neuroimmune Pharmacology*, [s.l.], v. 8, n. 4, p.857-866, 10 maio 2013. Springer Nature.

WIECZOREK, M.; SWIERGIEL, A. H.; POURNAJAFI-NAZARLOO, H.; DUNN, A. J. Physiological and behavioral responses to interleukin-1beta and LPS in vagotomized mice. *Physiol. Behav.*, v. 85, p. 500–511, 2005.

WILLNER P. Depression: A psychobiological synthesis. **John Wiley & Sons**, new York, 1985.

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

XIE, Y. *et al.* . Effects of nanoparticle zinc oxide on spatial cognition and synaptic plasticity in mice with depressive-like behaviors. *Journal of biomedical science*, v. 19, p. 14, 2012.

YIRMIYA, Raz; RIMMERMAN, Neta; RESHEF, Ronen. Depression as a Microglial Disease. *Trends In Neurosciences*, [s.l.], v. 38, n. 10, p.637-658, out. 2015.

YOUN, J et al. Beneficial effects of rosmarinic acid on suppression of collagen induced arthritis. *J Rheumatol*, [s.l.], v. 30, p.1203-1207, 15 set. 2014.

ZHANG, Jin-jin et al. Rosmarinic Acid Inhibits Proliferation and Induces Apoptosis of Hepatic Stellate Cells. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, [s.l.], v. 34, n. 3, p.343-348, jan. 2011.

ZOMKOWSKI, A.D.E., Hammes, L., Lin, J., Calixto, J.B., Santos, A.R.S., Rodrigues, A.L.S. Agmatine produces antidepressant-like effects in two models of depression in mice. *NeuroReport*, v. 13, p. 387-391, 2002.

