

André Roberto Da Silva Colla

Efeito tipo-antidepressivo e tipo-ansiolítico do ácido ursólico em camundongos em diferentes modelos animais

Orientadora: Ana Lúcia Severo Rodrigues

Tese de Doutorado apresentada à Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Neurociências.

Florianópolis
2015

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

Colla, André Roberto Da Silva

Efeito tipo-antidepressivo e tipo-ansiolítico do ácido
ursólico em camundongos em diferentes modelos animais /
André Roberto Da Silva Colla ; orientadora, Ana Lúcia
Severo Rodrigues - Florianópolis, SC, 2015.
168 p.

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

Inclui referências

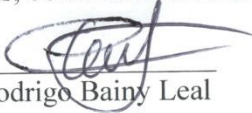
1. Neurociências. 2. Ácido ursólico. 3. Efeito tipo-
antidepressivo. 4. Neurobiologia da Depressão. 5.
Neuropsicobiologia. I. Rodrigues, Ana Lúcia Severo. II.
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-
Graduação em Neurociências. III. Título.

ANDRÉ ROBERTO DA SILVA COLLA

**“EFEITO TIPO-ANTIDEPRESSIVO E TIPO-ANSIOLÍTICO
DO ÁCIDO URSÓLICO EM CAMUNDONGOS EM
DIFERENTES MODELOS ANIMAIS”.**

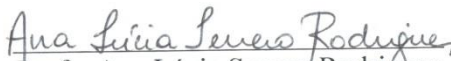
Esta tese foi julgada e aprovada para a obtenção do Grau de
Doutor em Neurociências na área de Neuropsicobiologia no
Programa de Pós-Graduação em Neurociências da Universidade
Federal de Santa Catarina

Florianópolis, 06 de abril de 2015.



Prof. Rodrigo Bairy Leal
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:



Prof. Ana Lúcia Severo Rodrigues
Orientadora – UFSC




Prof. Alcir Luiz Dafré
Membro – UFSC



Prof. Cláudia Pinto Figueiredo
Membro da Banca Externo


Prof. Josiane Budni
Membro da Banca Externo


Prof. Manuella Pinto Kaster
Membro - UFSC



Prof. Maribel Antonello Rubin
Membro da Banca Externo

“A minha esposa e família”

AGRADECIMENTOS

À minha família por tudo.

À minha esposa Giseli Caroline Lando Colla, e família, por estarem juntos em todos os momentos.

À professora Ana Lucia Severo Rodrigues, pela amizade, confiança e orientação prestada.

Ao Freddy por me receber em casa com carinho todos os dias, independente de qualquer coisa.

Aos colegas, e amigos, de laboratório. Todos foram muito importantes durante todo este tempo, e assim continuarão sendo, sempre. Ágatha, Anna, Andiara, Camille, Dayane, Francis, Julia, Luana, Luis, Manuella, Maurício, Morgana, Patrícia, Priscila, Vicente, Vivian.

Aos professores do PPG em Neurociências e Bioquímica pela excelente contribuição para minha formação.

Aos colegas de Pós-Graduação pela amizade, colaboração e respeito.

Ao Nivaldo, pela atenção, tratamento, amizade e auxílio prestado.

Aos meus amigos, perto ou longe, juntos. Em especial, Cadore e Caro, Guilherme, Murilo, Patrick e Priscila, Russo e esposa, Mateus e Maguiane, Felipe e Suelen.

Lidinei e Alessandra, Marcelo (e família) e Tamara, pelos bons momentos juntos, pela amizade, e por tornarem esses anos em Florianópolis anos felizes.

A CAPES pelo apoio financeiro.

A todos que de alguma forma colaboraram para a realização desta etapa.

LISTA DE ABREVIATURAS

5-HT = Serotonina.

8-OHDPAT = 8-hidroxi-2-(di-npropilamino)-tetralina

ANOVA = Análise de variância

ASN = Teste da Alimentação Suprimida pela Novidade

ATC = Antidepressivo tricíclico

BDNF = Fator neurotrófico derivado do encéfalo

BrdU = Bromodeoxiuridina

CCE = Teste da caixa claro/escuro

CEUA = Comissão de ética no uso de animais

CORT = Protocolo de administração repetida de corticosterona

CPF = Córtex pré-frontal

D₁ e D₂ = Subtipos de receptores dopaminérgicos

DA = Dopamina

DCX = doublecortina

E.P.M. = Erro padrão da média

ECI = Estresse crônico imprevisível

GD = Giro denteado

GDNF = Fator neurotrófico derivado da glia

GR = Glutaciona redutase

GR's = Receptores glicocorticoides

GSH = Glutaciona reduzida

GSH/GSSG = Razão glutaciona reduzida/oxidada

i.c.v. = Intracerebroventricular

i.p. = Intraperitoneal

i-MAO = Inibidor da monoamina oxidase

IL = Interleucina

ISRN = Inibidor seletivo da recaptação de norepinefrina

ISRS = Inibidor seletivo da recaptação de serotonina

LAM = Labirinto aquático de Morris

LCE = Labirinto em cruz elevado

MAO = Enzima monoamina oxidase

MDA = Malondialdeído

MR = Receptores mineralocorticoides

NE = Norepinefrina

NeuN = Antígeno neuronal nuclear

p.o. = per oral (via oral)

pCREB = Proteína de ligação ao elemento de resposta ao AMPc fosforilada

PPSE = Potencial pós-sináptico excitatório
SOD = Superóxido dismutase
TBS = Teste de borrifagem de sacarose
TCA = Teste do campo aberto
TCS = Teste de consumo de sacarose
TMC = Teste do medo condicionado
TNF = Teste do nado forçado
TNF- α = Fator de necrose tumoral alfa
TON = Teste do objeto novo
TPQ = Teste da placa quente
TPS = Teste de preferência por sacarose
TrkB = tropomiosina cinase B
TSC = Teste de suspensão pela cauda
v:v = Volume:volume

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO / CONSIDERAÇÕES FINAIS

Figura 1. Representação das principais decorrências sociais da depressão.....	26
Figura 2. Depressão como uma doença multifatorial.....	28
Figura 3. Diferentes tratamentos antidepressivos, eficácia e efeitos colaterais.....	29
Figura 4. Relação entre estresse e liberação de glicocorticoides.....	31
Figura 5. Papel das proteínas pró e anti-apoptóticas.....	32
Figura 6. Hipótese monoaminérgica da depressão e mecanismo de ação de antidepressivos monoaminérgicos.....	33
Figura 7. Hipótese neurotrófica da depressão.....	36
Figura 8. Estrutura química do ácido ursólico.....	56
Figura 9. Resumo gráfico.....	132

CAPÍTULO 1. SISTEMAS DE NEUROTRANSMISSORES RELACIONADOS AO EFEITO TIPO-ANTIDEPRESSIVO DO ÁCIDO URSÓLICO EM CAMUNDONGOS

Figura 1. 1. Teste de suspensão pela cauda (TSC).....	68
Figura 1. 2. Teste do campo aberto (TCA).....	69
Figura 1. 3. Envolvimento do sistema serotoninérgico no efeito tipo-antidepressivo do AU no TSC.....	73
Figura 1. 4. Envolvimento do sistema noradrenérgico no efeito tipo-antidepressivo do AU no TSC.....	75
Figura 1. 5. Envolvimento do sistema glutamatérgico no efeito tipo-antidepressivo do AU no TSC.....	77
Figura 1. 6. Envolvimento do sistema opióide no efeito tipo-antidepressivo do AU no TSC.....	78

CAPÍTULO 2. A ADMINISTRAÇÃO DE ÁCIDO URSÓLICO PROTEGE CONTRA O COMPORTAMENTO TIPO-DEPRESSIVO INDUZIDO PELO PROTOCOLO DE ESTRESSE CRÔNICO IMPREVISÍVEL EM CAMUNDONGOS

Figura 2. 1. Protocolo experimental.....	86
Figura 2. 2. Teste de borrifagem de sacarose (TBS).....	88
Figura 2. 3. Teste do campo aberto circular.....	89
Figura 2. 4. Efeito do AU no comportamento tipo-depressivo induzido pela ECI no TSC.	91
Figura 2. 5. Efeito do AU no comportamento tipo-depressivo induzido pela ECI noTBS.	92
Figura 2. 6. Efeito do tratamento com AU na locomoção e no comportamento tipo-ansioso induzido pelo ECI no TCA.....	93
Figura 2. 7. Expressão gênica (RNAm) de Bcl-2 e Bax.	94
Figura 2. 8. Níveis de corticosterona sérica.	95

CAPÍTULO 3. EFEITOS DO ÁCIDO URSÓLICO EM UM MODELO DE COMPORTAMENTO TIPO-DEPRESSIVO INDUZIDO PELA ADMINISTRAÇÃO REPETIDA DE CORTICOSTERONA

Figura 3. 1. Protocolo experimental.....	103
Figura 3. 2. Teste de consumo de sacarose (TCS).	103
Figura 3. 3. Efeito do AU no comportamento tipo-depressivo induzido por CORT no TSC e TCS.	105
Figura 3. 4. Efeito do tratamento com AU na atividade locomotora e nos parâmetros de ansiedade avaliados no TCA.	106
Figura 3. 5. Níveis de corticosterona sérica.	107
Figura 3. 6. Níveis de BDNF no córtex pré-frontal.	108

CAPÍTULO 4. EFEITO ANSIOLÍTICO DA ADMINISTRAÇÃO AGUDA DE ÁCIDO URSÓLICO EM CAMUNDONGOS

Figura 4. 1. Teste do labirinto em cruz elevado (LCE).	117
Figura 4. 2. Teste da caixa claro/escuro (CCE).....	118
Figura 4. 3. Teste de esconder esferas (TEE).....	119
Figura 4. 4. Efeito da administração aguda de AU no TCA.....	120
Figura 4. 5. Efeito da administração aguda de AU no LCE.	121
Figura 4. 6. Efeito da administração aguda de AU na CCE.	122
Figura 4. 7. Efeito da administração aguda de AU no TEE.	123

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Tabela 1. Critérios diagnósticos da depressão de acordo com o DSM-V.	27
Quadro 1. Diferentes estudos utilizando o modelo do ECI em suas implicações em camundongos.	39
Quadro 2. Diferentes estudos utilizando o modelo CORT em suas implicações em camundongos.	47
Quadro 3. Diferentes espécies de plantas nas quais o AU está presente e seus usos etnofarmacológicos.	60
Quadro 4. Protocolo de comportamento tipo-depressivo induzido pelo protocolo do estresse imprevisível.	87

SUMÁRIO

RESUMO	21
ABSTRACT	23
1. INTRODUÇÃO	25
1.1. Depressão	25
1.2. Modelos animais de depressão	37
1.3. Ácido ursólico	55
2. JUSTIFICATIVA	63
3. OBJETIVOS	65
3.1. Objetivo geral	65
3.2. Objetivos específicos	65
CAPÍTULO 1. SISTEMAS DE NEUROTRANSMISSORES relacionados ao EFEITO TIPO-ANTIDEPRESSIVO DO ÁCIDO URSÓLICO EM CAMUNDONGOS	67
1.1. Materiais e métodos	67
1.1.1. Animais	67
1.1.2. Agentes farmacológicos	67
1.1.3. Teste de suspensão pela cauda (TSC)	68
1.1.4. Teste do campo aberto (TCA)	68
1.1.5. Tratamentos farmacológicos	69
1.1.6. Administração i.c.v.	70
1.1.7. Análise estatística	71
1.2. Resultados	71

1.2.1. Envolvimento do sistema serotoninérgico no efeito tipo-antidepressivo do AU no TSC	71
1.2.2. Envolvimento do sistema noradrenérgico no efeito tipo-antidepressivo do AU no TSC	74
1.2.3. Envolvimento do sistema glutamatérgico no efeito tipo-antidepressivo do AU no TSC	76
1.2.4. Envolvimento do sistema opióide no efeito tipo-antidepressivo do AU no TSC	78
1.3. Discussão	79

CAPÍTULO 2. A ADMINISTRAÇÃO DE ÁCIDO URSÓLICO PROTEGE CONTRA O COMPORTAMENTO TIPO-DEPRESSIVO INDUZIDO PELO ESTRESSE CRÔNICO IMPREVISÍVEL EM CAMUNDONGOS

85

2.1. Materiais e métodos	85
2.1.1. Animais	85
2.1.2. Ferramentas farmacológicas e tratamento.....	86
2.1.3. Procedimento experimental.....	86
2.1.4. Teste de suspensão pela cauda (TSC).....	87
2.1.5. Teste de borrifagem de sacarose (TBS).....	87
2.1.6. Teste do campo aberto (TCA).....	88
2.1.7. Extração de RNA, síntese de cDNA e reação em cadeia da polimerase em tempo real (qRT-PCR).....	89

2.1.8. Níveis de corticosterona no soro	90
2.1.9. Análise estatística.....	90
2.2. Resultados	91
2.2.1. Efeito do tratamento com AU no comportamento tipo-depressivo induzido pela ECI no TSC e ST	91
2.2.2. Efeito do tratamento com AU e do protocolo de ECI na locomoção e no tempo no centro no TCA.....	93
2.2.3. Efeito do tratamento com AU na expressão gênica (RNAm) de Blc-2 e Bax.....	93
2.2.4. Dosagem de corticosterona	95
2.3. Discussão.....	95

CAPÍTULO 3. EFEITOS DO ÁCIDO URSÓLICO EM UM MODELO DE COMPORTAMENTO TIPO-DEPRESSIVO INDUZIDO PELA ADMINISTRAÇÃO REPETIDA DE CORTICOSTERONA.

3.1 Material e métodos	102
3.1.1 Animais	102
3.1.2. Ferramentas farmacológicas e tratamentos	102
3.1.3. Teste de suspensão pela cauda (TSC)	103
3.1.4. Teste de consumo de sacarose (TCS).....	103
3.1.5 Teste do campo aberto (TCA).....	104
3.1.6. Níveis de corticosterona no soro	104
3.1.7. Níveis de BDNF no córtex pré-frontal	104

3.1.8. Análise estatística.....	104
3.2. Resultados.....	105
3.2.1. Efeito do tratamento com AU no comportamento tipo-depressivo induzido por CORT no TSC e TCS	105
3.2.2. Efeito do tratamento com AU na atividade locomotora e nos parâmetros de ansiedade avaliados no TCA.	106
3.2.3. Efeito do tratamento com AU sobre os níveis séricos de corticosterona de camundongos submetidos ou não a CORT.....	107
3.2.4. Níveis de BDNF no córtex pré-frontal de camundongos submetidos ou não a CORT e tratados com AU	108
3.3. Discussão	109

CAPÍTULO 4. EFEITO TIPO-ANSIOLÍTICO CAUSADO PELA ADMINISTRAÇÃO AGUDA DE ÁCIDO URSÓLICO EM CAMUNDONGOS

4.1. Material e métodos.....	116
4.1.1. Animais e tratamento	116
4.1.2. Teste do campo aberto (TCA).....	116
4.1.3. Labirinto em cruz elevado (LCE)	117
4.1.4. Caixa claro-escuro (CCE).....	117
4.1.5. Teste de esconder esferas (TEE).....	118
4.1.6. Análise estatística.....	119
4.2. Resultados.....	119

4.2.1. Efeito da administração aguda de AU no TCA.....	119
4.2.2. Efeito da administração aguda de AU no LCE	121
4.2.3. Efeito da administração aguda de AU na CCE	122
4.2.4. Efeito da administração aguda de AU no TEE.....	123
4.3 Discussão.....	123
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS	129
5. CONCLUSÕES.....	133
6. PERSPECTIVAS	135
Referências	137

RESUMO

A depressão é uma doença crônica e recorrente, altamente prevalente e responsável por considerável perda de produtividade e qualidade de vida, que pode apresentar comorbidade com os transtornos de ansiedade. O tratamento disponível para estas doenças apresenta várias limitações, o que tem levado à investigação de novas estratégias terapêuticas. O ácido ursólico (AU) é um triterpenóide pentacíclico encontrado em diferentes plantas medicinais que possuem efeito tipo-antidepressivo em testes comportamentais como o teste de suspensão pela cauda (TSC) e o teste do nado forçado. Este trabalho avalia em camundongos: (i) os sistemas de neurotransmissores relacionado ao efeito tipo-antidepressivo do AU no TSC; (ii) os efeitos da administração repetida por 7 dias com AU (0,1 mg/kg, p.o.) em um modelo de comportamento tipo-depressivo induzido pelo estresse crônico imprevisível (ECI); (iii) os efeitos da administração repetida por 7 dias com AU em um modelo de comportamento tipo-depressivo induzido pela administração repetida por 21 dias com corticosterona (CORT) 20 mg/kg, p.o.; (iv) o efeito ansiolítico do AU em diferentes testes comportamentais. Os resultados obtidos foram: (i) a pré-administração de PCPA (100 mg/kg, i.p., 4 dias), um inibidor da síntese de serotonina, assim como de AMPT (100 mg/kg, i.p.), um inibidor da síntese de norepinefrina e dopamina, foram capazes de prevenir o efeito tipo-antidepressivo do AU (0,1 mg/kg, p.o.) no TSC. A administração conjunta de doses sub-efetivas de AU (0,001 mg/kg, p.o.) com fluoxetina (5 mg/kg, p.o.), inibidor seletivo da recaptção de serotonina, e com reboxetina (2 mg/kg, p.o.), inibidor seletivo da recaptção de norepinefrina, produziu uma resposta antidepressiva não alcançada pelo tratamento com somente um dos compostos. Nenhum dos tratamentos afetou a atividade locomotora no teste do campo aberto (TCA). Este conjunto de resultados sugere o envolvimento dos sistemas serotoninérgico e noradrenérgico no efeito tipo-antidepressivo do AU. Ainda, o tratamento com doses sub-efetivas de cetamina (0,1 mg/kg, i.p.) ou MK-801 (0,001 mg/kg, p.o.), antagonistas de receptores NMDA, em conjunto com AU (0,001 mg/kg, p.o.), não causou efeito tipo-antidepressivo no TSC. Os tratamentos com NMDA (0,1 pmol/camundongo, i.c.v.), agonista de receptores NMDA, e com naloxona (1 mg/kg, i.p.), um antagonista não seletivo de receptores opióides, não preveniram o efeito tipo-antidepressivo do AU no TSC. Estes resultados indicam que o efeito tipo-antidepressivo do AU possivelmente não seja mediado pelo sistema opióide ou por uma

modulação dos receptores NMDA. (ii) o tratamento repetido com AU preveniu o comportamento tipo-depressivo induzido pelo ECI avaliado no TSC e no teste de borrifagem de sacarose. Ainda preveniu o aumento no RNAm da proteína pró-apoptótica Bax e a diminuição da razão Bcl-2/Bax no hipocampo induzidas pelo modelo; (iii) o tratamento repetido com AU preveniu o comportamento tipo-depressivo induzido pelo protocolo CORT no TSC e teste de consumo de sacarose, e tipo-ansioso no TCA, assim como preveniu a diminuição dos níveis de BDNF no córtex pré-frontal dos camundongos submetidos a este protocolo; (iv) A administração aguda de AU (10 mg/kg, p.o.) mostrou efeito tipo-ansiolítico no TCA e no teste do labirinto em cruz elevado, mas não na caixa claro-escuro e no teste de esconder esferas. Em conjunto, os resultados encontrados indicam que o AU apresenta efeito tipo-antidepressivo dependente, ao menos em parte, da participação do sistema monoaminérgico, associado à modulação de Bcl-2, Bax e BDNF, e também apresenta efeito tipo-ansiolítico em camundongos. Desta forma, os resultados sugerem que o AU poderá vir a se constituir em uma estratégia terapêutica para o tratamento da depressão e ansiedade, indicando a necessidade de estudos futuros neste sentido.

Palavras-Chave: ácido ursólico, ansiolítico, antidepressivo.

ABSTRACT

Depression is a chronic, recurrent and highly prevalent disorder, responsible for a considerable loss of productivity and quality of life. This psychiatric disorder is often comorbid with anxiety disorders. The available treatment for these diseases has several drawbacks, which has led to the investigation of new therapeutic strategies. Ursolic acid (UA) is a pentacyclic triterpenoid found in several medicinal plants that have antidepressant-like effect in behavioral tests such as the tail suspension test (TST) and forced swimming test (FST). This study investigates in mice: (i) the neurotransmitter systems involved in the UA antidepressant-like effect in the TST; (ii) the effects of repeated administration for 7 days with UA (0.1 mg / kg, p.o.) in an animal model of depression induced by chronic unpredictable stress (CUS); (iii) the effects of repeated administration for 7 days with UA in an animal model of depression induced by the repeated administration for 21 days with corticosterone (CORT) 20 mg/kg, p.o.; (iv) the anxiolytic-like effect of UA in different behavioral tests. The following results were obtained: (i) pre-administrations of PCPA (100 mg/kg, i.p.), an inhibitor of serotonin synthesis, as well as AMPT, an inhibitor norepinephrine and dopamine synthesis, were able to prevent the effect antidepressant-like effect of UA (0.1 mg/kg, p.o.) in the TST. Co-administration of sub-effective doses of UA (0.001 mg/kg, p.o.) with fluoxetine (5 mg/kg, p.o.), a selective serotonin reuptake inhibitor, and reboxetine (2 mg/kg, p.o.), a selective norepinephrine reuptake inhibitor, produced an antidepressant response not achieved by treatment with only one of the compounds. None of the treatments altered locomotor activity of mice in the open-field test (OFT). This set of results suggests the involvement of serotonergic and noradrenergic systems in the antidepressant-like effect of UA. Furthermore, treatment with sub-effective doses of ketamine (0.1 mg/kg, i.p.) or MK-801 (0.001 mg/kg, p.o.), NMDA receptor antagonists, in combination with UA (0.001 mg/kg, p.o.), did not cause an antidepressant-like effect in the TST. The treatments with NMDA (0.1 pmol/mouse, i.c.v.), an NMDA receptor agonist, and naloxone (1 mg/kg, i.p.), a non-selective opioid receptor antagonist, did not prevent the antidepressant-like effect of UA in the TST. These results indicate that the antidepressant-like effect of UA is likely not mediated by opioid system or NMDA receptor modulation. (ii) Repeated treatment with UA prevented the depressive-like behavior induced by CUS evaluated in the TST and Splash Test and also prevented the increased gene expression (mRNA) of the pro-apoptotic protein Bax and the decreased Bcl-2/Bax

ratio induced by CUS; (iii) the repeated UA treatment prevented the CORT-induced depressive-like behavior assessed in the TST and sucrose consumption test, and the anxiolytic-like behavior in the open-field test. Moreover, UA treatment prevented the decrease in BDNF levels in the prefrontal cortex of mice subjected to this protocol; (iv) Acute administration of UA (10 mg/kg, p.o.) elicited anxiolytic-like effect in the OFT and in the elevated plus-maze test, but not in the light-dark box and marble burying test. Taken together, the results indicate that UA has antidepressant-like effect dependent on, at least in part, the participation of the monoaminergic systems and Bcl-2, Bax and BDNF modulation. It also exhibits anxiolytic-like effect in mice. Therefore, altogether the results suggest that UA may be a novel therapeutic strategy for the treatment of depression and anxiety, indicating the need for further research dealing with this issue.

Keywords: antidepressant, anxiolytic, ursolic acid

1. INTRODUÇÃO

1.1. Depressão

A depressão é um dos transtornos neuropsiquiátricos mais comumente diagnosticados, com estimativas de atingir entre 17% a 21 % da população mundial ao longo da vida (GREENBERG et al., 2003; SCHECHTER et al., 2005; ASCHBACHER et al., 2012), sendo tanto a ocorrência quanto a recorrência maior em mulheres do que em homens (SOARES e ZITEK, 2008; BULLOCH et al., 2013). Esta doença pode ser considerada um problema de saúde pública (NESTLER e CARLEZON, 2006), sendo que de acordo com dados da Organização Mundial da Saúde este transtorno será, em 2020, a segunda maior causa de incapacitação. Em 2030 a depressão pode chegar ao posto de principal doença responsável pela perda de anos de vida por morte prematura (podendo dobrar o risco) ou por anos vividos sem plena saúde (MURRAY e LOPEZ, 1997; CUIJPERS e SMIT, 2002; LEPINE e BRILEY, 2011). Ainda, os acometidos pela doença podem apresentar limitação da sua atividade e bem-estar, levando à incapacidade e perda de produtividade (CASSANO e FAVA, 2002; EBMEIER, DONAGHEY e STEELE, 2006), além de uma maior utilização de serviços de saúde (NEMEROFF, 2007). Tendo em vista que se trata de uma doença crônica e recorrente, fortemente associada ao risco de suicídio, torna-se uma das principais geradoras de custos socioeconômicos aos serviços de saúde e governos (Figura 1) (MATHERS e LONCAR, 2006; BRANCHI et al., 2013; HUNTER et al., 2013).

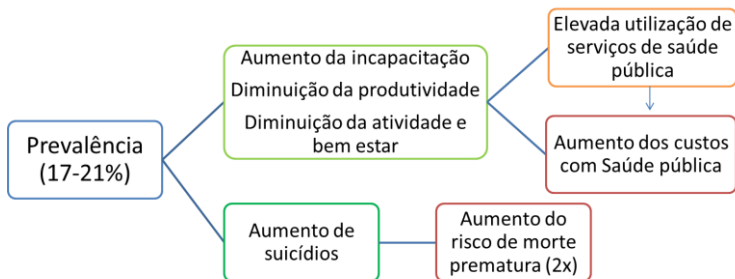


Figura 1. Representação das principais decorrências sociais da depressão.

A depressão é uma doença de alta prevalência, que pode causar incapacitação, diminuição de produtividade e de bem estar, contribuindo para um aumento na utilização dos serviços de saúde pública e consequente elevação nos gastos governamentais. Ainda, aumenta o risco para suicídio e morte prematura. Fonte: Do autor.

De acordo com o Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais, quinta edição (DSM-V, 2013), o diagnóstico clínico da depressão requer a presença de cinco ou mais dos sintomas apresentados na Tabela 1, sendo necessária a presença de ao menos um sintoma dos sintomas considerados principais, humor deprimido ou anedonia. De acordo com o número de critérios identificados, o estado depressivo pode ser classificado em três grupos: 1) Depressão menor: 2 a 4 sintomas por duas ou mais semanas, incluindo estado deprimido ou anedonia; 2) Depressão maior: 5 ou mais sintomas por duas semanas ou mais, incluindo estado deprimido ou anedonia; 3) Distímia: 3 ou 4 sintomas, incluindo estado deprimido, durante dois anos, no mínimo (DSM-V, 2013; BENTLEY, PAGALILAUAN e SIMPSON, 2014)

Tabela 1. Critérios diagnósticos da depressão de acordo com o DSM-V.

1. Humor deprimido (sentimento de tristeza, vazio, falta de esperança)
2. Anedonia (interesse ou prazer acentuadamente diminuído em quase todas as atividades e quase todos os dias)
3. Sentimentos de culpa ou desvalia
4. Perda / ganho de peso ou apetite não intencional
5. Agitação psicomotora / letargia
6. Fadiga ou falta de energia
7. Insônia / hipersônia
8. Dificuldade de concentração, de pensar e de tomar decisões
9. Pensamentos recorrentes de morte ou suicídio

Fonte: Manual Diagnóstico e Estatístico dos Distúrbios Mentais, quinta edição (DSM-V, 2013).

Diferentes fatores podem ser responsáveis pelo desencadeamento e estabelecimento de um quadro depressivo, como, por exemplo, os fatores genéticos (hereditários) e ambientais, gerando alterações bioquímicas, fisiológicas e também morfológicas, tornando a depressão uma doença multifatorial (Figura 2) (FILE, 1996; NESTLER et al., 2002; BERTON e NESTLER, 2006). Além disso, a depressão pode apresentar comorbidades com outras doenças, tais como doenças cardiovasculares, neurológicas e câncer (NESTLER et al., 2002). Em relação às comorbidades, sabe-se que a depressão pode coexistir com os transtornos de ansiedade, podendo a comorbidade ansiedade/depressão ser considerada como regra e não exceção, com uma ocorrência maior do que a da depressão ou da ansiedade sozinhas (BAKISH, 1999; STEIN et al., 2001). Dados mostram que cerca de 58% dos pacientes depressivos sofrem de ansiedade e cerca de 80% dos pacientes com ansiedade generalizada apresentam sintomas depressivos. Ainda, quando a depressão e a ansiedade ocorrem em conjunto, elas estão associadas com sintomas mais graves, maiores prejuízos causados pelas doenças, curso crônico, menor êxito do tratamento e maior incidência de suicídio (BAKISH, 1999; FAVA et al., 2000). De fato, estas doenças possuem uma alta taxa de comorbidade e podem compartilhar diferentes aspectos fisiopatológicos (POLLACK, 2005; HETTEMA, 2008). Devido à alta prevalência de pacientes com a comorbidade ansiedade e depressão e a importância da busca de tratamentos mais eficazes, são necessários estudos que investiguem compostos que apresentem eficácia não

somente para o tratamento da depressão, mas também para a depressão associada à ansiedade, ampliando as alternativas terapêuticas para o tratamento destes pacientes (BAKISH, 1999).



Figura 2. Depressão como uma doença multifatorial.

Diferentes fatores estão envolvidos no estabelecimento da doença, a qual está associada a diversas alterações de ordem bioquímica, fisiológica e morfológica. Fonte: Do autor.

Os fármacos antidepressivos representam o tratamento padrão para a depressão (BRANCHI et al., 2013). Estes podem agir de diferentes maneiras, como inibindo a enzima monoamina oxidase (MAO), atuando sobre os sistemas de recaptação das monoaminas serotonina (5-HT), norepinefrina (NE) e dopamina (DA) seletivamente, como os inibidores seletivos da recaptação de 5-HT (ISRS) ou da recaptação de NE (ISRN), ou em conjunto como é o caso dos antidepressivos classificados como tricíclicos (ATCs) ou atípicos, aumentando a concentração destes neurotransmissores na fenda sináptica (RESSLER e NEMEROFF, 1999; NEMEROFF e OWENS, 2002; NEMEROFF, 2003). Apesar da disponibilidade de numerosos agentes para o tratamento da depressão, a eficácia dos medicamentos disponíveis atualmente ainda é baixa, tendo em vista que aproximadamente metade dos pacientes não responde à terapia de primeira escolha e mais de 65% dos pacientes não alcançam a remissão

completa dos sintomas, podendo-se afirmar que nenhum tratamento é completamente curativo (HAMON e BLIER, 2013; LEVINSTEIN e SAMUELS, 2014). Além disso, a resposta terapêutica destes fármacos pode ser considerada tardia e traz em conjunto o aparecimento de uma variedade de efeitos colaterais indesejáveis, tais como sedação, diminuição da pressão sanguínea, aumento de peso, indigestão e disfunção sexual. Estes fatores, muitas vezes, resultam em uma baixa adesão e abandono do tratamento por parte dos pacientes, podendo promover recorrência dos sintomas depressivos e até mesmo ao aumento do risco de suicídio (Figura 3) (KELLER et al., 2002; LANG e BORGWARDT, 2013). De fato, os efeitos colaterais são a razão mais comum para a descontinuação da terapia medicamentosa por parte dos pacientes (BENTLEY, PAGALILAUAN e SIMPSON, 2014). Desta forma, existe uma grande necessidade do desenvolvimento de terapias antidepressivas alternativas ou de substâncias que possam aumentar a eficácia clínica no tratamento da depressão.

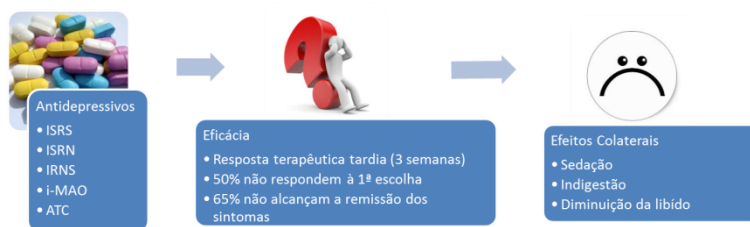


Figura 3. Diferentes tratamentos antidepressivos, eficácia e efeitos colaterais.

O tratamento da depressão pode ser realizado com a utilização de diferentes classes de antidepressivos, porém além de necessitarem de um tempo relativamente longo para atingir os efeitos os tratamentos não são totalmente eficazes. Ainda, os efeitos colaterais relacionados ao uso dos antidepressivos podem levar o paciente ao abandono do tratamento. Abreviaturas: ISRS = Inibidor seletivo da recaptação de serotonina; ISRN = Inibidor seletivo da recaptação de norepinefrina; IRNS = Inibidor da recaptação de norepinefrina e serotonina; i-MAO = Inibidor da monoamina oxidase; ATC = Antidepressivo tricíclico. Fonte: Do autor.

A depressão é também descrita como uma doença fortemente relacionada ao estresse. A literatura demonstra uma forte associação

entre estresse e depressão, sendo os eventos estressantes estreitamente associados com o risco para o desencadeamento da depressão (POST, 1992; HAMMEN, 2005). Acredita-se que cerca de 80% dos casos de depressão podem ser precedidos pela ocorrência de fatores e acontecimentos estressantes (BROWN e HARRIS, 1978). Estudos demonstram uma correlação entre o acontecimento de significativos episódios estressantes antes do aparecimento de episódios depressivos graves em pacientes (POST, 1992; HORESH, KLOMEK e APTER, 2008). Ainda, o estresse crônico parece ser um dos principais fatores ambientais que predis põem um indivíduo à depressão, o qual pode causar aumento dos níveis plasmáticos de glicocorticoides, desregulação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) e consequente morte de neurônios hipocampais (Figura 4) (NESTLER et al., 2002). Nesta condição pode ocorrer redução da neurogênese, aumento da expressão de proteínas pró-apoptóticas, redução de proteínas anti-apoptóticas e redução do fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF), sendo estas alterações passíveis de serem revertidas com o tratamento crônico com antidepressivos convencionais (NESTLER et al., 2002; PITTENGER e DUMAN, 2008). A apoptose também parece ser um evento relacionado ao estresse e depressão, tanto em humanos quanto em modelos animais (MCKERNAN, DINAN e CRYAN, 2009). Estudos indicam ainda um aumento da apoptose no encéfalo, principalmente no hipocampo, de animais submetidos a modelos de depressão induzidos pelo estresse, sendo esta condição prevenida pelo tratamento com antidepressivos (MANJI e DUMAN, 2001; LUCASSEN, FUCHS e CZECH, 2004). O processo apoptótico é geralmente controlado por proteínas pró-apoptóticas, como Bax e Bad, por exemplo, e anti-apoptóticas, como Bcl-2 e Bcl-Xl, por exemplo (Figura 5) (CORY e ADAMS, 2002).

Diferentes estruturas encefálicas têm sido relacionadas com os transtornos depressivos e com a fisiopatologia da depressão (PITTENGER e DUMAN, 2008). Pacientes depressivos podem apresentar redução do volume de estruturas límbicas como o córtex pré-frontal e o hipocampo (BREMNER, 2002; CAMPBELL et al., 2004), em parte decorrentes da atrofia e morte neuronal, bem como da diminuição de fatores neurotróficos, aumento de proteínas pró apoptóticas e consequente ativação de vias de morte celular (NESTLER et al., 2002; CASTREN, 2004; KRISHNAN e NESTLER, 2008; PITTENGER e DUMAN, 2008; MASI e BROVEDANI, 2011). No hipocampo ocorre morte neuronal, redução no tamanho do corpo celular dos neurônios, perda de arborização dendrítica e de processos

gliais (HICKIE et al., 2005). O córtex pré-frontal dorsolateral apresenta uma redução no tamanho dos neurônios e na densidade de células gliais (COTTER et al., 2002; PARADISE et al., 2012), assim como a densidade neuronal e glial também se encontra alterada no córtex órbito-frontal lateral e no giro do cíngulo anterior em pacientes depressivos (ONGUR, DREVETS e PRICE, 1998; RAJKOWSKA et al., 1999; COTTER et al., 2002).

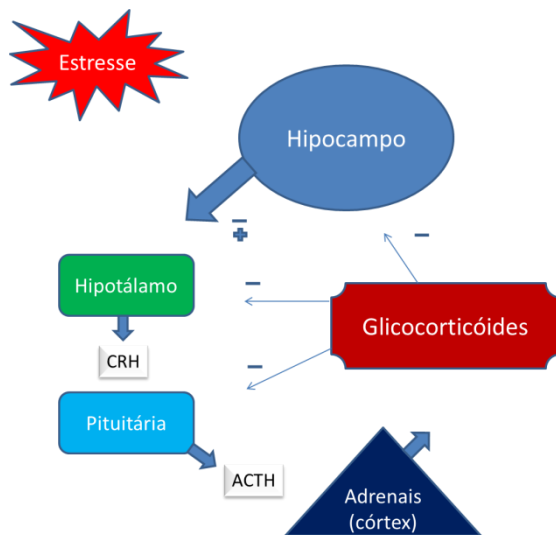


Figura 4. Relação entre estresse e liberação de glicocorticóides.

O estresse é um estímulo para a secreção do hormônio liberador de corticotrofina (CRH) pelo hipotálamo. Por sua vez, o CRH estimula a hipófise a secretar o hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) o qual no córtex das glândulas adrenais estimula a liberação de glicocorticóides. A persistência e a intensidade exagerada do estresse podem tornar o eixo hiper-reativo, com prejuízos potenciais ao organismo (HUETHER et al., 1999; GILLESPIE e NEMEROFF, 2005). Fonte: Do autor.

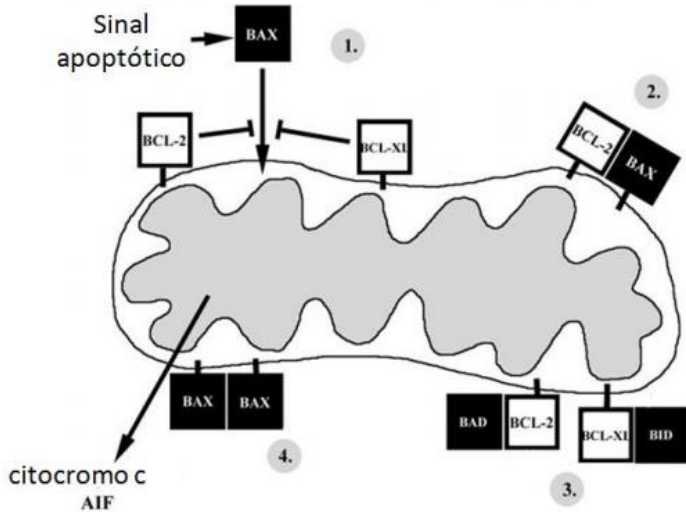


Figura 5. Papel das proteínas pró e anti-apoptóticas.

Um sinal apoptótico estimula a translocação da Bax do citoplasma para a mitocôndria (1). A Bcl-2 e a Bcl-xL bloqueiam o efeito pró-apoptótico se ligando a Bax e formando heterodímeros (2). Porém, outras proteínas pró-apoptóticas como a Bad e Bid podem interagir com a Bcl-2 e a Bcl-xL prevenindo sua ação anti-apoptótica (3). Quando o número de proteínas pró-apoptóticas supera as anti-apoptóticas, as pró-apoptóticas ficam livres para atuar sobre a membrana mitocondrial. Ocorre então perda do potencial de membrana e liberação de moléculas promotoras de apoptose, como o citocromo c e o fator indutor de apoptose (AIF) (VASKIVUO et al., 2002). Fonte: Adaptado de Engel (2013).

A etiologia da depressão ainda não está totalmente elucidada, mas muitos estudos demonstraram que a neurotransmissão monoaminérgica, a qual envolve a 5-HT, NE e a DA, exerce grande influência sobre os circuitos cerebrais envolvidos na regulação do humor, reatividade ao estresse psicológico, autocontrole, motivação e desempenho cognitivo (HAMON e BLIER, 2013). Uma alteração na atividade monoaminérgica cerebral, com consequente redução dos níveis de monoaminas na fenda sináptica, seria, segundo a hipótese monoaminérgica, um dos principais fatores responsáveis pelo estabelecimento da doença (SCHILDKRAUT, 1965; ELHWUEGI, 2004). De fato, o tratamento farmacológico para a depressão envolve o

aumento da atividade monoaminérgica no encéfalo, afetando diretamente a circuitaria neuronal monoaminérgica, principalmente de áreas límbicas e cortico-frontais (Figura 6) (SCHILDKRAUT, 1965; CUMMINGS, 1993; ELHWUEGI, 2004; NEMEROFF, 2007; HAMON e BLIER, 2013).

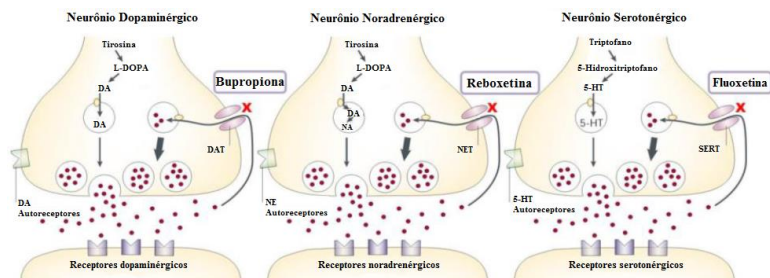


Figura 6. Hipótese monoaminérgica da depressão e mecanismo de ação de antidepressivos monoaminérgicos.

Na depressão, a concentração de monoaminas (DA, NE e 5-HT) na fenda sináptica está diminuída, acarretando o transtorno de humor. O bloqueio dos sítios de recaptação (em vermelho) aumenta a disponibilidade dos neurotransmissores monoaminérgicos, os quais ativam seus receptores pós-sinápticos, sendo o humor restabelecido. Entre os antidepressivos que aumentam a disponibilidade de monoaminas, destacam-se a bupropiona (inibidor da recaptação de dopamina com atividade sutil sobre a recaptação de noradrenalina), a reboxetina (ISRN) e a fluoxetina (ISRS). Abreviaturas: 5-HT = serotonina; DA = dopamina; DAT = transportador de dopamina; NA = norepinefrina; NET = transportador de norepinefrina; L DOPA = levodopa (NEMEROFF e OWENS, 2002; HAMON e BLIER, 2013). Fonte: Adaptado de Freitas (2014).

O envolvimento do sistema serotonérgico na etiologia da depressão é amplamente relatado na literatura e fármacos que agem sobre este sistema têm sido largamente utilizadas no tratamento dos transtornos depressivos (RISCH e NEMEROFF, 1992; LICINIO e WONG, 2005). Sabe-se também, por exemplo, que o bloqueio farmacológico da síntese de 5-HT pela utilização do inibidor da enzima triptofano hidroxilase, *p*-cloro-fenilalanina (PCPA), é capaz de reverter o efeito antidepressivo de diferentes agentes farmacológicos, como i-MAO e ATCs, em pacientes depressivos (SHOPSIN et al., 1975; SHOPSIN, FRIEDMAN e GERSHON, 1976) e em modelos animais

de depressão (O'LEARY et al., 2007). Ainda, o sistema serotoninérgico parece estar associado à resposta ao estresse e a liberação de fatores neurotróficos, bem como uma deficiência neste sistema parece ter relação com a redução do volume hipocampal encontrada em pacientes depressivos (TAYLOR, W. D. et al., 2005).

O papel do sistema noradrenérgico na depressão também têm sido extensivamente relatado na literatura, sendo a NE um neurotransmissor fortemente ligado à regulação do humor e respostas a estímulos estressores (TAYLOR, C. et al., 2005). Os receptores α -adrenérgicos e β -adrenérgicos do córtex pré-frontal e frontal parecem estar intimamente associados com a depressão, assim como os níveis de NE na fenda sináptica encontram-se diminuídos na doença, os quais podem ser reestabelecidos pelo tratamento com fármacos antidepressivos (WONG e LICINIO, 2001; TAYLOR, C. et al., 2005; HAMON e BLIER, 2013). Ainda, a literatura demonstra que camundongos knockout para o transportador de NE apresentam um aumento nos níveis extracelulares de NE bem como um comportamento tipo-antidepressivo em testes comportamentais quando comparados aos camundongos selvagens (DZIEDZICKA-WASYLEWSKA et al., 2006).

Adicionalmente, variados estudos demonstram uma relação entre a transmissão dopaminérgica central e a depressão e têm postulado que a redução da função dopaminérgica está implicada na fisiopatologia da doença. Está bem reportado que o tratamento com alguns antidepressivos pode aumentar a transmissão dopaminérgica, contribuindo para uma diminuição dos sintomas depressivos, incluindo um dos principais sintomas de diagnóstico clínico, a anedonia, que por sua vez parece estar ligada a redução da sinalização dopaminérgica (D'AQUILA et al., 2000; CRYAN et al., 2001; DAILLY et al., 2004; PAPAKOSTAS, 2006). Além disso, a gravidade do episódio depressivo parece ser inversamente correlacionada aos níveis de metabólitos de DA no sistema nervoso central (SNC) (PAPAKOSTAS, 2006), os quais se encontram diminuídos em pacientes suicidas (ENGSTROM et al., 1999).

Além do estabelecido papel do sistema monoaminérgico na fisiopatologia da depressão, diversos outros sistemas de neurotransmissores estão envolvidos na patogênese da doença, como o sistema glutamatérgico (MACHADO-VIEIRA et al., 2012; KRYSZAL, SANACORA e DUMAN, 2013; MURCK, 2013) e o sistema opióide (VILPOUX et al., 2002; BERROCOSO, ROJAS-CORRALES e MICO, 2004). A hiperativação do sistema

glutamatérgico, e consequente excitotoxicidade devido ao aumento nos níveis de cálcio intracelular, pode desencadear uma série de eventos que culminam na morte celular (LIPTON e ROSENBERG, 1994). O estresse, assim como os níveis elevados de glicocorticoides (presentes em pacientes depressivos), são fatores relacionados com a excitotoxicidade glutamatérgica, que por sua vez está diretamente ligada aos transtornos de humor (LOWY, WITTENBERG e YAMAMOTO, 1995; ZARATE et al., 2002; NICIU, KELMENDI e SANACORA, 2012). Adicionalmente, a literatura demonstra níveis séricos de glutamato elevados em pacientes depressivos (MAURI et al., 1998), sendo estes níveis associados com a severidade dos sintomas (MITANI et al., 2006). Além disso, antagonistas de receptores NMDA possuem ação antidepressiva rápida em estudos pré-clínicos e clínicos (DIAZGRANADOS et al., 2010; LI et al., 2011; KRYSTAL, SANACORA e DUMAN, 2013).

Diversas evidências sugerem também o envolvimento do sistema opióide nos mecanismos subjacentes à fisiopatologia da depressão (VILPOUX et al., 2002; BERROCOSO, ROJAS-CORRALES e MICO, 2004). A ativação do sistema opióide parece estar implicada nos mecanismos que envolvem o efeito de compostos antidepressivos (SCHREIBER, BLEICH e PICK, 2002; BERROCOSO, ROJAS-CORRALES e MICO, 2004; BROCARD et al., 2009). Agonistas dos receptores μ -opióides, como oxicodona e oximorfona, são capazes de melhorar o estado de humor em pacientes com depressão maior refratária. (STOLL e RUETER, 1999). Ainda, estudos comportamentais demonstram a capacidade tanto de opióides endógenos, como de inibidores de enzimas de degradação destes, em promover um efeito tipo-antidepressivo, bem como em potencializar o efeito de compostos antidepressivos, sendo estes efeitos passíveis de serem revertidos pela administração de antagonistas opióides (DE FELIPE et al., 1989; BAAMONDE et al., 1992; TEJEDOR-REAL et al., 1995; KITA et al., 1997; TEJEDOR-REAL et al., 1998).

Adicionalmente à hipótese monoaminérgica, a hipótese neurotrófica da depressão postula que o tratamento com antidepressivos estimula a atividade neuronal e promove aumento da expressão de BDNF (RUSSO-NEUSTADT e CHEN, 2005). Eventos estressores agudos ou crônicos podem causar a diminuição da expressão de BDNF hipocampal em roedores e antidepressivos de diferentes classes podem reverter este quadro, prevenindo os efeitos deletérios do estresse (Figura 7) (DUMAN, 2004). De acordo, uma maior expressão de BDNF hipocampal foi observada em amostras postmortem de pacientes

depressivos tratados com antidepressivos, em comparação com amostras hipocampais de pacientes não submetidos à tratamento (CHEN et al., 2001).

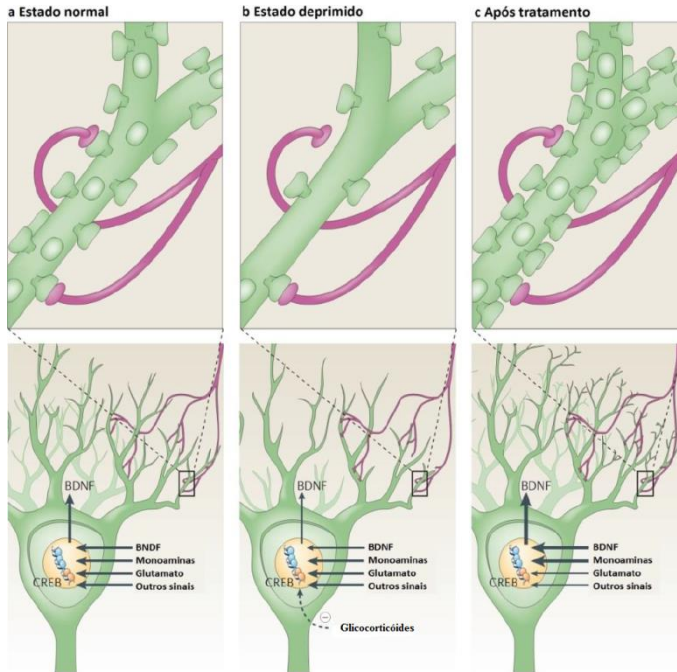


Figura 7. Hipótese neurotrófica da depressão.

Neurônio piramidal hipocampal em estado normal (a). Episódios de estresse grave causam alterações nestes neurônios, reduzindo sua arborização dendrítica e expressão de BDNF (b). A diminuição de BDNF é mediada em parte pelo excesso de glicocorticóides. Os antidepressivos revertem os efeitos deletérios produzidos pelo estresse e excesso de glicocorticóides aumentando a arborização dendrítica e expressão de BDNF (c). Fonte: Adaptado de Berton e Nestler (2006).

1.2. Modelos animais de depressão

Modelos animais de depressão são ferramentas indispensáveis na pesquisa que visa identificar novos compostos com possível ação antidepressiva e para fornecer conhecimentos a cerca das bases neurobiológicas desta doença (CRYAN, MARKOU e LUCKI, 2002) e baseiam-se principalmente em dois princípios: resposta a antidepressivos conhecidos e resposta ao estresse (NESTLER et al., 2002).

Modelos com validade preditiva, responsivos ao tratamento com antidepressivos, como o teste do nado forçado (TNF) e o teste de suspensão pela cauda (TSC) são amplamente utilizados para o estudo da depressão e na busca por novos agentes antidepressivos (NESTLER et al., 2002; BOURIN et al., 2005; MCARTHUR e BORSINI, 2006). O TNF foi descrito primeiramente em 1977, sendo utilizado em ratos (PORSOLT, LE PICHON e JALFRE, 1977) e posteriormente em camundongos (PORSOLT, BERTIN e JALFRE, 1977), enquanto o TSC foi descrito em camundongos em 1985 (STERU et al., 1985). Estes dois testes são considerados de fácil uso e de boa reprodutibilidade (CRYAN, MARKOU e LUCKI, 2002). Embora o TNF e o TSC possuam validades e objetivos similares, podem apresentar diferenças em relação aos substratos biológicos responsáveis pelo comportamento apresentado em cada um dos modelos (CRYAN, MOMBÉREAU e VASSOUT, 2005). A literatura propõe que o TSC seja um teste menos estressante e apresente maior sensibilidade farmacológica do que o TNF (THIERRY et al., 1986). Adicionalmente, tem sido postulado que o TNF não é um teste totalmente confiável para a detecção de antidepressivos que atuam como ISRS, uma vez que esses antidepressivos exibem respostas mais fidedignas no TSC (CRYAN, MOMBÉREAU e VASSOUT, 2005).

Além da validade preditiva, modelos animais de depressão com validade fenomenológica e/ou de constructo também são largamente utilizados na pesquisa de compostos com atividade tipo-antidepressiva. Dentre eles, destacam-se os modelos baseados na indução de estresse, nos quais ocorre a exposição dos animais a diferentes fatores estressantes por determinado período de tempo, acarretando em um comportamento considerado tipo-depressivo em testes comportamentais, como aumento no tempo de imobilidade no TSC e TNF, diminuição do consumo de sacarose (medida de anedonia) no teste de consumo de sacarose (TCS), aumento da latência e redução do tempo total de comportamento de autolimpeza corporal no teste de borrifagem de sacarose (TBS) (medidas de autocuidado e anedonia), bem como

diversas alterações bioquímicas relacionadas à depressão (WILLNER, MUSCAT e PAPP, 1992; YALCIN, AKSU e BELZUNG, 2005; MCARTHUR e BORSINI, 2006). Cabe destacar que o tratamento com antidepressivos pode atenuar ou impedir as alterações induzidas pelo estresse (MCARTHUR e BORSINI, 2006). Dentre os modelos baseados na exposição de animais ao estresse, destacam-se os modelos do estresse crônico moderado (WILLNER, MUSCAT e PAPP, 1992; WILLNER, 1997) e o do estresse crônico imprevisível (ECI), os quais reproduzem diferentes alterações comportamentais, bioquímicas e morfológicas relacionadas à depressão (Quadro 1) (LU et al., 2006). Outros modelos frequentemente utilizados na pesquisa são os modelos farmacológicos, os quais também podem induzir um comportamento tipo-depressivo através de alterações neuroquímicas semelhantes àquelas encontradas na depressão (MCARTHUR e BORSINI, 2006). Dentre os diferentes modelos farmacológicos, o modelo de depressão induzida pela administração repetida de corticosterona destaca-se por causar um aumento do tempo de imobilidade no TSC e TNF, diminuição do comportamento de autolimpeza no TBS, bem como redução da proliferação celular hipocampal e alteração no metabolismo de monoaminas (Quadro 2). Neste modelo, a administração de antidepressivos como, por exemplo, a fluoxetina, é capaz de impedir as alterações induzidas pelo mesmo (INOUE e KOYAMA, 1996; MURRAY, SMITH e HUTSON, 2008; DAVID et al., 2009).

Quadro 1. Diferentes estudos utilizando o modelo do ECI em suas implicações em camundongos.

Duração do Protocolo	Linhagem/ Sexo / Idade Aproximada ou peso	Alterações Comportamentais	Outras Alterações Relevantes	Referência
10 dias / 2 estressores/dia.	ICR / Machos / 90 dias de idade.	<ul style="list-style-type: none"> - ↑ Tempo de imobilidade no TSC e TNF; - ↓ Entradas e tempo nos braços abertos do LCE (%); - ↑ Número de esferas enterradas no TEE. 	<ul style="list-style-type: none"> - ↑ Expressão gênica (RNAm) de Bcl-2 e Bax no hipocampo e de caspase-3 no hipocampo e amígdala; - ↓ Expressão gênica (RNAm) de Bcl-2 e ↑ de Bax na amígdala. 	(DING et al., 2014).
21 dias / 1 estressor/dia.	C57/BL6 / Machos / 65 dias de idade.	<ul style="list-style-type: none"> - ↑ Tempo de imobilidade no TNF. 	<ul style="list-style-type: none"> - ↑ Atividade da atividade da catalase, superóxido dismutase e relação GSH/GSSG no encéfalo. 	(FARIA et al., 2014).
28 dias / 1-2 estressores/dia.	C57BL/6 / Fêmeas / 210 dias de idade.	<ul style="list-style-type: none"> - Não avaliadas. 	<ul style="list-style-type: none"> - Níveis séricos de corticosterona não alterados. 	(GRASSI et al., 2014).
28 dias / 1 estressor/dia.	Swiss Albino / Machos / Idade não especificada (adulto).	<ul style="list-style-type: none"> - Locomoção no TCA não alterada; - ↑ Tempo de imobilidade no TNF; - ↓ Preferência por 	<ul style="list-style-type: none"> - ↓ Peso corporal; - ↑ Níveis de corticosterona no plasma; - ↓ Níveis de 5-HT no hipocampo, CPF e 	(GUPTA, RADHAKRISHNA N e KURHE, 2014).

		sacarose no TPS.	cerebelo.	
35 dias / 2 estressores/dia.	C57BL/6J / Machos / 65 dias de idade.	- Locomoção e tempo no centro no TCA não alterados; - ↑ Tempo de imobilidade no TNF; - ↑ Latência no ASN.	- ↓ Células marcadas BrdU+ e DCX+ no GD.	(ZHANG et al., 2014).
21 dias / 1 estressor/dia.	REDD1-knockout e Wild type / Machos / Idade não especificada (30g).	- ↓ Consumo de sacarose.	- ↓ Densidade de espinhas sinápticas e ↓ PPSE induzido por 5-HT no CPF medial.	(OTA et al., 2014).
28 dias / 1 estressor/dia.	Laca / Machos / 85 dias de idade.	- ↑ Latência para alcançar a plataforma e ↓ do tempo no quadrante correto no LAM.	- ↑ Concentração de MDA e nitrito e ↓ de níveis de GSH e atividade da catalase e SOD no hipocampo; - ↑ Níveis de Corticosterona no soro; - ↑ Níveis hipocampais de TNF- α .	(RINWA e KUMAR, 2014).
21 dias / 1 estressor/dia.	C57BL/6N / Machos / 35 dias de idade.	↑ Tempo de imobilidade no TSC; - Locomoção no TCA não alterada.	- ↓ Peso corporal.	(YOON et al., 2014).

14 dias / 1 estressor/dia.	C57BL/6J / Machos / 90 dias de idade.	- ↑ Latência para alimentação no ASN.	- ↓ Células BrdU+ e DCX+ no hipocampo.	(CAMPOS et al., 2013b).
21 dias / 1 estressor/dia.	Swiss Albino / Machos / 35 dias de idade.		- ↑ Níveis de MDA, ↓ dos níveis de GSH e ↓ atividade de SOD, catalase e GR no plasma; - ↑ Níveis de glicose no plasma. - Peso corporal inalterado.	(HASAN et al., 2013).
28 dias / 1 estressor/dia.	Kunming / Machos / 50 dias de idade.	- ↑ Tempo de imobilidade no TNF; - ↑ Latência para alcançar a plataforma e ↓ do tempo no quadrante correto no LAM.	- Peso corporal inalterado.	(LIAO et al., 2013).
28 dias / 2 estressores/dia.	CD1 / Machos / Idade não especificada (20g).	- ↑ Tempo de imobilidade no TNF; - ↓ Preferência por sacarose no TPS.		(NASCA et al., 2013).
28 dias / 1 estressor/dia.	Laca / Machos / Idade não especificada (30g).	- ↑ Latência para alcançar a plataforma e ↓ do tempo no quadrante correto no	- ↑ Concentração de MDA e nitrito e diminuição de níveis de GSH e da atividade de	(RINWA e KUMAR, 2013).

		LAM.	catalase e SOD no hipocampo; - ↑ Níveis de Corticosterona no soro; - ↑ Níveis hipocampais de TNF- α .	
28 dias / 2 estressores/dia.	C57BL/6 / Machos / 35 dias de idade.	- ↓ Consumo de sacarose; - ↑ Imobilidade no TSC; - ↑ Número de esferas enterradas no TEE.	- Níveis de RNAm para TNF- α e IL-1 no mesencéfalo e hipocampo e níveis de corticosterona no plasma inalterados.	(BARNUM et al., 2012).
40 dias / 1 estressor/dia.	Kunming / Machos / 90 dias de idade.	- ↑ Latência para alcançar a plataforma e ↓ nas entradas no quadrante correto no LAM.	- ↑ Níveis de GDNF no hipocampo e no CPF medial.	(BIAN et al., 2012).
21 dias / 1 estressor/dia.	ICR / Machos / Idade não especificada (20g).	- ↓ Consumo de sacarose.	- ↓ Níveis de 5-HT, NE e DA no encéfalo; - ↑ Níveis de MDA e ↓ da atividade de SOD no soro.	(HUANG et al., 2012).
14 dias / 1 estressor por dia.	Swiis Albino / Fêmeas / 50 dias de idade.	- ↑ Tempo de imobilidade no TSC; - Locomoção inalterada no TCA;	- Níveis séricos de corticosterona inalterados; - ↑ Níveis de TBARS no	(MORETTI et al., 2012).

		- ↓ Autolimpeza no TBS.	córtex e hipocampo e ↓ dos níveis de GSH no córtex; - ↓ Atividade de catalase no córtex e hipocampo e de GR no hipocampo.	
28 dias / 1 estressor/dia.	Laca / Machos / Idade não especificada (30g).	- ↓ Locomoção no TCA; - ↓ Preferencia por sacarose no TPS; - ↑ Latência para alcançar a plataforma e ↓ do tempo no quadrante correto no LAM.	- ↑ Concentração de MDA e nitrito e ↓ de níveis de GSH e da atividade de catalase e SOD no encéfalo; - ↑ Níveis de Corticosterona no plasma.	(RINWA e KUMAR, 2012).
30 dias / 3 estressores/dia.	Swiss Albino / Fêmeas / 35 dias de idade.	- ↓ Locomoção e levantamentos verticais, ↑ tempo na periferia no TCA.	- ↑ Níveis de Corticosterona no plasma.	(WU et al., 2012a).
30 dias / 1 estressor/dia.	Swiss aLBINO/ Fêmeas / 28 dias de idade.	- ↓ Locomoção e levantamentos verticais, ↑ tempo na periferia no TCA.		(WU et al., 2012b).
7-14-21-28-35-42 e 49 dias / 1 estressor/dia.	C57BL/6N / Machos / 60 dias de idade.	- ↓ Tempo de imobilidade após 7 dias de protocolo, ↑	- ↑ Níveis de BDNF no hipocampo após 7 dias e diminuição após 35 e 49	(ZHAO et al., 2012).

		após 35 e 49 dias de protocolo no TNF e no TSC.	dias de protocolo; ↑ Níveis séricos de corticosterona após 7 dias, com redução ao longo das semanas de protocolo.	
28 dias / 1 estressor/dia.	C57BL/6J / Machos / 90 dias de idade.	- ↓ Tempo no quadrante correto no LAM.	- ↓ Peso corporal; - Níveis séricos de corticosterona inalterados.	(BISAZ, SCHACHNER e SANDI, 2011).
10 dias / 2 estressores/dia.	Swiss Albino / Machos e Fêmeas / Idade não especificada (20g).	- ↑ Latência para saída do braço aberto no LCE (parâmetro de memória).	- ↑ Glicose no plasma; - ↑ Níveis séricos de corticosterona e peso das adrenais; - ↑ níveis de TBARS e ↓ dos níveis de GSH no soro; - ↓ Peso corporal.	(BHATIA et al., 2011).
28 dias / 1-2 estressores/dia.	Swiss Albino / Machos / 40 dias de idade.		- ↓ atividade de SOD, catalase, GST e GR e dos níveis de GSH e ↑ dos níveis de MDA no encéfalo.	(HASAN et al., 2011).
28 dias / 1 estressor/dia.	C57BL/6J / Machos / 240 dias de idade.	- ↑ Freezing no TMC; - ↑ Latência para entrada e ↓ tempo de	- ↓ Peso corporal; - Níveis séricos de corticosterona	(BISAZ e SANDI, 2010).

		permanência no compartimento claro da CCE.	inalterados.	
28 dias / 1-2 estressores/dia.	C57BL/6 / Fêmeas / 180 dias de idade.	- Imobilidade no TNF inalterada; - ↓ Tempo nos braços abertos do LCE.	- Peso corporal inalterado.	(LAGUNAS et al., 2010).
14 dias / 2 estressores/dia.	GHRS Knockout e wild type / Machos / 45 dias de idade.		- ↓ Peso corporal; - ↑ Níveis corticosterona no plasma.	(PATTERSON et al., 2010).
35-60 dias / 2-3 estressores/dia.	C57BL/6J / Machos / 60 dias de idade.	- ↓ Consumo de sacarose; - ↑ Tempo de imobilidade no TNF e da latência para alimentação na ASN.	- ↓ Peso corporal e ↑ peso das adrenais; - Níveis séricos de corticosterona inalterados.	(WANG et al., 2010).
52 dias / 1-2 estressores dias.	BDNF knockout e wild type / Machos e Fêmeas / 40 dias de idade.	- ↓ Locomoção TCA; - ↑ Latência para alimentação na ASN.	- Níveis séricos de corticosterona inalterados; - ↓ RNAm para BDNF no hipocampo.	(AUTRY et al., 2009).
24 dias / 1 estressor/dia.	ICR / Machos / Idade não especificada (20g).	- ↑ Tempo de imobilidade no TSC; - Locomoção e levantamentos	- ↑ Atividade de MAO-A e MAO-B no encéfalo; - ↑ Níveis de MDA e de GSH no encéfalo.	(MAO et al., 2009).

		verticais não alterados no TCA.		
7 dias / 2 estressores/dia.	Swiss Albino / Machos / Idade não especificada (30g).	- Não avaliados.	- ↑ Níveis de corticosterona no plasma; - ↓ Níveis de 5-HT, NE e DA no córtex e hipocampo; - ↑ Níveis de IL-2 e IL-6 no córtex e hipocampo.	(RASHEED et al., 2008).

ASN = Alimentação suprimida pela novidade; BDNF = Fator neurotróficos derivado do encéfalo; BrdU = Bromodeoxiuridina; CCE = Caixa claro/escuro; CPF = Córtex pré-frontal; DA = Dopamina; DCX = doublecortin; ECI = Estresse crônico imprevisível; GD = Giro Denteado; GDNF = Fator neurotrófico derivado da glia; GSH = Glutathiona reduzida; GSH/GSSG = Razão glutathiona reduzida/oxidada; GR = Glutathiona redutase; IL = Interleucina; LAM = Labirinto aquático de Morris; LCE = Labirinto em cruz elevado; MDA = Malondialdeído; NE = Norepinefrina; PPSE = Potencial pós-sináptico excitatório; SOD = Superóxido dismutase; TCA = Teste do campo aberto; TEE = Teste de esconder esferas; TMC = Teste do medo condicionado; TNF = Teste do nado forçado; TNF- α = Fator de necrose tumoral alfa; TPS = Teste de preferência por sacarose; TSC = Teste de suspensão pela cauda; 5-HT = Serotonina.

* Trabalhos buscados na base de dados PUBMED pelos termos: mice + chronic stress + depression. Sendo selecionados 31 artigos no período de 2008 a 2015. Fonte: Do autor.

Quadro 2. Diferentes estudos utilizando o modelo CORT em suas implicações em camundongos.

Duração do Protocolo/Via de administração	Linhagem/ Sexo / Idade Aproximada ou peso	Alterações Comportamentais	Outras Alterações Relevantes	Referência
28 dias / 35 µg/ml na água de beber.	C57BL/6J / Machos / 56 dias de idade.	<ul style="list-style-type: none"> - ↓ Frequência e tempo de exploração do objeto novo no TON; - ↓ Tempo de freezing no TMC. - ↓ Entradas e tempo de permanência no quadrante correto no LAM; - ↓ Tempo de permanência no quadrante correto e visitas ao esconderijo no Labirinto de Barnes. 		(DARCET et al., 2014).
28 dias / 35 µg/ml na água de beber.	C57BL/6J / Machos / 50 dias de idade.	<ul style="list-style-type: none"> - ↑ Duração do sono (em 24h e período noturno); - ↓ Tempo no centro e da locomoção no TCA. 		(LE DANTEC et al., 2014).

21 dias / 20 mg/kg, s.c..	ICR / Machos / Idade não especificada (20g).	- ↓ Consumo de sacarose; - ↑ Tempo de imobilidade no TNF e TSC.	- ↓ Níveis de BDNF e RNAm para BDNF no hipocampo.	(MAO et al., 2014).
21 dias / 20mg/kg, p.o..	Swiss / Fêmeas / Idade não especificada (30g).	- ↑ Tempo de imobilidade no TSC; - ↑ Latência e ↓ do tempo total de autolimpeza no TBS; - Locomoção inalterada no TCA.	- ↓ Níveis de corticosterona no soro.	(ROSA et al., 2014).
84 dias / 100 µg/ml na água de beber.	C57BL/6NCrl / Machos / 120 dias de idade.	- Tempo nos braços abertos do LCE inalterado; - ↑ Número de bolos fecais no TCA.	- ↑ Peso corporal.	(VAN DONKELAAR et al., 2014).
21 dias / 20mg/kg, s.c..	ddY / Machos / 35 dias de idade.	- ↑ Tempo de imobilidade no TNF; - Locomoção inalterada no TCA.	- ↑ Níveis de DA extracelular no CPF; - Níveis de 5-HT e glutamato inalterados.	(AGO et al., 2013).
42 dias / 35 µg/ml na água de beber.	129Sv/Ev / Machos / 50 dias de idade.	- ↑ Latência para alimentação no ASN; - ↓ Tempo no centro no TCA, sem alterações	- ↓ Níveis de BDNF no encéfalo; - ↓ Células BrdU+ e de espinhas dendríticas no giro denteado;	(CRUPI et al., 2013).

		locomotoras; - Imobilidade inalterada no TNF.	- ↑ Níveis de Bax e ↓ de Bcl-2 no encéfalo.	
55 dias / 6-7 mg/kg/dia na água de beber.	C57BL/6J / Machos / 55 dias de idade.	- ↓ Tempo no centro no TCA; - ↑ Latência para alimentação no ASN; - Piora no estado do pelo (coat state); - ↓ Latência para lambida no TPQ.		(HACHE et al., 2012).
49 dias / 35 ug/ml na água de beber.	CD-1 / Machos / Idade não especificada (25g).	- ↓ Tempo no centro no TCA; - ↓ Tempo de permanência no lado claro na CCE; - ↓ Número de entradas nos braços abertos no LCE; - ↑ Tempo de imobilidade no TSC.	- ↓ Níveis de TrkB no CPF e hipocampo; - Sem alterações nos níveis de pró-BDNF e BDNF maduro no CPF e hipocampo.	(KUTIYANAWA LLA, TERRY e PILLAI, 2011).
14 e 21 dias / 20mg/kg, s.c..	Swiss / Fêmeas / Idade não especificada (25g).	- ↓ Entradas e tempo de permanência nos braços abertos do LCE; - ↑ Tempo de		(SILVA et al., 2013).

		<p>imobilidade no TSC e TNF;</p> <ul style="list-style-type: none"> - Locomoção inalterada no TCA. 		
21 dias / 40mg/kg, s.c..	ICR / Machos / 35 dias de idade.	<ul style="list-style-type: none"> - ↑ Tempo de imobilidade no TNF; - ↓ Consumo de sacarose; - Locomoção inalterada no TCA. 	<ul style="list-style-type: none"> - ↑ Níveis de 5-HT no hipocampo; - ↓ Receptores MR no hipocampo e hipotálamo. 	(WU, T. C. et al., 2013).
14 dias / 25 ug/ml na água de beber.	C57BL/6 / Machos / 65 dias de idade.		- ↓ Níveis de BDNF no giro denteado.	(GOURLEY et al., 2012).
49 dias / 35 ug/ml na água de beber.	C57BL/6J / Machos / 50 dias de idade.		<ul style="list-style-type: none"> - Prevenção da hipotermia e da diminuição nos níveis extracelulares de 5-HT induzidos por 8-OHDPAT. 	(RAINER et al., 2012a).
49 dias / 35 ug/ml na água de beber.	CD1 / Machos / 50 dias de idade.	<ul style="list-style-type: none"> - Piora no estado do pelo (coat state); - ↑ Consumo de água e comida; - ↓ Tempo no centro no TCA, sem alterações 	<ul style="list-style-type: none"> - ↑ Peso corporal; - ↓ Células BrdU+ no giro denteado. 	(CRUPI et al., 2011).

		locomotoras; - ↑ Latência para alimentação na ASN; - Tempo de imobilidade no TNF não alterado.		
49 dias / 35 µg/ml (5 mg/kg/dia) na água de beber.	CD1 / Machos / 45 dias de idade.		- ↓ Níveis séricos de corticosterona; - Sem alterações no peso corporal; - ↓ Níveis de GR's no córtex frontal.	(HOWELL, KUTIYANAWALLA e PILLAI, 2011).
65 dias / 20 mg/L na água de beber.	C57BL/6 / Machos / 21 dias de idade.	- ↑ Tempo de imobilidade no TNF e no TSC.	- Sem alteração nos níveis séricos de corticosterona; - Níveis séricos de corticosterona inalterados após estresse agudo no grupo CORT, diferindo do aumento no grupo estresse agudo; - ↓ Níveis de MR no hipocampo; - ↑ Células BrdU+ no hipocampo.	(XU et al., 2011).

8 dias / 40mg/kg, s.c..	ddY / Machos / 50 dias de idade.		<ul style="list-style-type: none"> - ↓ Células BrdU+ no giro denteado.; ↓ Níveis de pCREB no giro denteado; - ↓ Expressão de RNAm para BDNF no giro denteado. 	(YABE et al., 2010).
28 dias / 35 ug/ml/dia (5 mg/kg/dia).	C57BL/6Ntac / Machos / 50 dias.	<ul style="list-style-type: none"> - ↓ Tempo de permanência e número de entradas no centro no TCA; - ↓ Latência no ASN. - ↓ Frequência de autolimpeza no teste de borrifagem de sacarose; - Piora no estado de aparência do animal (coat state). 	- ↓ Células BrdU+ no hipocampo.	(DAVID et al., 2009).
6, 18 e 36 dias / 20mg/kg, s.c..	C57BL/6N / Machos / Idade não especificada (20g).	<ul style="list-style-type: none"> - ↓ Tempo de imobilidade no TNF após 6 dias e ↑ após 36 dias de tto; - ↓ Tempo de imobilidade no TSC após 6 dias e ↑ após 	- Sem alterações em células NeuN+ nas regiões hipocampais CA1, CA3 e giro denteado após 36 dias de tto.	(ZHAO et al., 2009).

21 dias / 20mg/kg, s.c..	ddY / Machos / 35 dias de idade.	18 e 36 dias de tto. - ↑ Tempo de imobilidade no TNF e TSC; - Locomoção inalterada no TCA.	- ↓ Níveis de GR's no CPF; - ↓ Níveis de corticosterona séricos em um grupo experimental. Sem alteração nos níveis em outro grupo experimental; - Níveis séricos de corticosterona inalterados após estresse agudo (TNF) no grupo CORT, diferindo do aumento no grupo estresse agudo; - ↑ Níveis extracelulares de DA, porém não de 5-HT no CPF.	(AGO et al., 2008).
7, 14, 21 e 28 dias / 5 mg/pellet (40 mg/kg), pellets	CD1 / Machos / Idade não especificada (20g).	- ↑ Tempo de imobilidade após 7 dias de tto, sem alterações em 14 ou	- ↑ Níveis de corticosterona no plasma após 7, 14 e 21 dias, porém não após 28	(MURRAY, SMITH e HUTSON, 2008).

subcutâneos.		21 dias; - ↓ Velocidade no lado claro da CCE, sem alterações no tempo de permanência no lado claro.	dias de tto; - ↓ Peso das adrenais após 7, 14 e 21 dias, porém não após 28 dias de tto; - ↓ Células BrdU+ no hipocampo em todos os tempos de tto; - ↓ Volume hipocampal com 14 dias de tto e da camada celular granular com 14 e 21 dias de tto, sem diferenças para ambos após 28 dias de tto.	
--------------	--	--	--	--

5-HT = Serotonina; 8-OHDPAT = 8-hidroxi-2-(di-npropilamino)-tetralina; ASN = Alimentação suprimida pela novidade; BDNF = Fator neurotróficos derivado do encéfalo; BrdU = Bromodeoxiuridina; CCE = Caixa claro/escuro; DA = Dopamina; GR's = Receptores glicocorticoides; LAM = Labirinto aquático de Morris; MR = Receptores mineralocorticoides; NeuN = Antígeno neuronal nuclear; pCREB = Proteína de ligação ao elemento de resposta ao AMPc fosforilada; TBS = Teste de borrifagem de sacarose; TMC = Teste do medo condicionado; TNF = Teste do nado forçado; TON = Teste do objeto novo; TPQ = Teste da placa quente; TrkB = tropomiosina cinase B; TSC = Teste da suspensão pela cauda.

* Trabalhos buscados na base de dados PUBMED pelos termos: mice + corticosterone + depression. Sendo selecionados 21 artigos no período de 2008 a 2015. Fonte: Do autor.

1.3. Ácido ursólico

O ácido ursólico (ácido 3-beta-hidróxi-urso-12-eno-28-óico) (AU) (Figura 8), é um triterpenóide pentacíclico encontrado em diversas plantas medicinais, principalmente da medicina oriental. Também está presente na dieta humana, uma vez que pode ser encontrado em diferentes partes das plantas, incluindo nos frutos como, por exemplo, na casca da maçã (BABALOLA e SHODE, 2013). Possui uma ampla gama de efeitos biológicos descritos na literatura e tem sido extensivamente estudado quanto aos seus efeitos antitumorais, antioxidantes e anti-inflamatórios (LIU, 1995; LU et al., 2010). Possui um perfil farmacológico seguro quanto a sua toxicidade e capacidade de chegar ao SNC após sua administração oral (NOVOTNY, VACHALKOVA e BIGGS, 2001; SOMOVA et al., 2003; AGGARWAL, TAKADA e OOMMEN, 2004; CHEN et al., 2011).

O AU tem surgido como uma estratégia nutricional para o aumento da massa muscular, sendo utilizado como suplementação na dieta de praticantes de treinos de resistência. Um estudo avaliou os efeitos da sua suplementação (450 mg/dia, pelo período de 8 semanas) em homens saudáveis submetidos a um programa de treinamento de resistência. Neste grupo foi observado uma diminuição na porcentagem de gordura corporal, aumento dos níveis do fator de crescimento semelhante a insulina tipo 1 e também de irisina, bem como aumento da força muscular. Este trabalho não avaliou ou relatou possíveis efeitos colaterais oriundos da suplementação com AU (BANG et al., 2014). Um estudo demonstrou que a infusão intravenosa de AU associado a nanolipossomas, pelo período de 14 dias em pacientes saudáveis e também com tumores avançados, foi bem tolerada, com baixa incidência de efeitos colaterais relatados (náusea, diarreia e distensão abdominal), os quais ocorreram em grau leve na maioria dos casos (ZHU et al., 2013). Outros estudos que avaliaram a administração intravenosa de AU associado a lipossomas revelam boa tolerabilidade, com poucos relatos de efeitos colaterais e em grau leve, porém uma possível hepatotoxicidade em doses elevadas não é descartada (QIAN et al.; ZHAO et al., 2011). Outro estudo, utilizando o AU associado a nanopartículas poliméricas para aplicação ocular, não demonstrou ocorrência de irritação ocular ou toxicidade em testes in vivo (Coelhos New Zealand machos avaliados por 7 dias) e in vitro (membrana corioalantóide de ovos de galinha) (ALVARADO et al., 2015). Seu isômero, ácido oleanólico, é comercializado na China para doenças hepáticas (LIU, 1995). A administração aguda deste isômero (1 g/kg, s.c.) em camundongos e ratos não demonstrou mortalidade, bem como

sua administração repetida em humanos (180 mg/kg, p.o.), pelo período de 10 dias, não demonstrou anormalidades em diferentes órgãos. Ainda, sua administração prolongada (60-90 mg/kg/dia, 30-90 dias) não revelou a presença de efeitos adversos aparentes indicando ser um composto seguro (LIU, 1995).

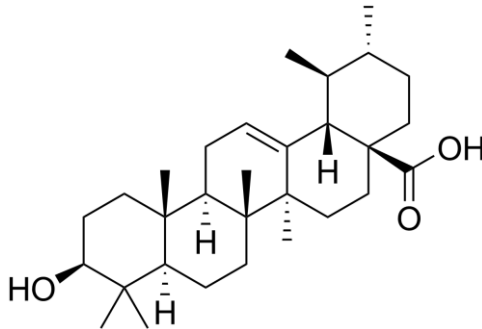


Figura 8. Estrutura química do ácido ursólico.

Fonte: Do autor.

Dentre os diferentes efeitos do AU relatados na literatura, alguns se destacam devido às suas relações com o SNC. Quando isolado de *Agastache mexicana*, uma planta amplamente utilizada na medicina tradicional mexicana para o tratamento de ansiedade, distúrbios do sono e dor, o AU demonstrou efeito antinociceptivo em camundongos quando avaliados no teste de contorções abdominais induzidas pela administração de ácido acético, de nocicepção induzido pela administração de formalina e em um modelo de nocicepção induzida por capsaicina, sendo este efeito relacionado à participação do sistema serotoninérgico (VERANO et al., 2013). Em ratos, produziu efeito antinociceptivo no teste de contorções abdominais induzidas pela administração de ácido acético e no teste da placa quente (TAVIANO et al., 2007).

O AU apresenta a capacidade de proteger contra déficits cognitivos induzidos pela administração de lipopolissacarídeo em camundongos, quando avaliados no labirinto aquático de Morris e no teste da esQUIVA inibitória. Também protege contra o aumento de marcadores próinflamatórios como interleucina 1- β , interleucina 2, interleucina 6, fator de necrose tumoral- α , entre outros, ocasionado pelo modelo utilizado (WANG, Y. J. et al., 2011). Ainda, foi demonstrado que o AU possui efeito neuroprotetor contra a neurotoxicidade induzida

pela D-Galactose em camundongos idosos (LU et al., 2007). Nestes animais a administração oral de AU pelo período de 2 semanas foi capaz de proteger contra os déficits de aprendizado e memória espacial avaliados no teste do labirinto aquático de Morris (LU et al., 2007). Adicionalmente, protegeu contra a diminuição da atividade de diferentes enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase, catalase, glutatona peroxidase e glutatona redutase, bem como contra o aumento no conteúdo de malondialdeído, produto da peroxidação lipídica, demonstrando um potencial efeito antioxidante (LU et al., 2007). Ainda, reverteu a ativação da caspase-3, enzima envolvida em vias de morte celular, no modelo utilizado, o qual é relacionado à alterações idade dependentes. Estes dados sugerem o AU apresenta potencial terapêutico para doenças relacionadas ao envelhecimento, como depressão, doença de Alzheimer e demência (LU et al., 2007).

Outro estudo utilizando o modelo da administração de D-galactose demonstrou atividade protetora do AU contra o déficit de aprendizado no teste da esQUIVA inibitória e no labirinto aquático de Morris, proteção contra o aumento de produtos finais de glicação avançada, espécies reativas de oxigênio e proteínas glicadas, ambos relacionados com o aumento do estresse oxidativo. Neste modelo, ainda foi relatado que o AU foi capaz de reduzir a expressão de marcadores inflamatórios como ciclooxigenase-2, óxido nítrico sintase indutível, interleucina 1 β , interleucina 6 e fator de necrose tumoral- α e inibir a ativação do fator nuclear- κ -B, um fator de transcrição associado à morte celular, inibindo a translocação nuclear do fator nuclear- κ -B p65 no córtex pré-frontal de camundongos (LU et al., 2010). Desta forma, o AU foi proposto como um composto com potencial para o tratamento de doenças como diabetes mellitus, arteriosclerose e doenças neurodegenerativas (LU et al., 2010). Também foi demonstrado que o AU foi efetivo em um modelo de disfunção mitocondrial e déficits cognitivos induzidos pela administração de ácido domóico em camundongos quando avaliados no labirinto aquático de Morris e no teste da esQUIVA inibitória (WU, D. M. et al., 2013). Além disso, em um estudo que avaliou 139 espécies de ervas quanto à capacidade de inibição da enzima acetil colinesterase in vitro, o AU foi o componente ativo do extrato de *Origanum majorana* L. que apresentou o maior efeito inibitório da acetil colinesterase entre as espécies avaliadas. Teve este efeito confirmado quando testado isoladamente, sendo proposto como um alvo de estudos na busca por medicamentos para a doença de Alzheimer (CHUNG et al., 2001). Em ratos, demonstrou atividade anticolinesterásica no hipocampo, além de promover um efeito

facilitatório nas etapas de aquisição e consolidação da memória. Além disso, reverteu a amnésia induzida pela escopolamina em ratos avaliados na tarefa da esQUIVA inibitória (BERTÉ, 2009).

O AU parece ser capaz de inibir a ligação do peptídeo beta-Amiloide com a microglia, reduzindo a produção de citocinas pró-inflamatórias e espécies reativas de oxigênio, o que sugere o seu potencial terapêutico em relação a doença de Alzheimer (WILKINSON et al., 2011; YOO e PARK, 2012). Estudos demonstraram seu efeito neuroprotetor contra a toxicidade induzida pela proteína beta-Amiloide (25-35) em células PC12, sendo este efeito relacionado à sua capacidade antioxidante (HEO et al., 2002; HONG, JEONG e JUN, 2012). Foi demonstrado também seu efeito protetor contra a morte celular induzida pela neurotoxina 1-metil-4-fenilpiridina (MPP⁺) ou peróxido de hidrogênio em células PC12 através de mecanismos antioxidantes e anti-inflamatórios. O AU demonstrou ainda ser capaz de reverter alterações em parâmetros de dano oxidativo causados pelo MPP⁺ e peróxido de hidrogênio e de atenuar o aumento de interleucina-6 e do fator de necrose tumoral- α neste protocolo experimental, reforçando seus efeitos anti-inflamatórios e potencial efeito para o tratamento de doenças neurodegenerativas, como a doença de Parkinson, por exemplo (TSAI e YIN, 2008). Além disso, o AU foi capaz, de maneira dose-dependente, de proteger neurônios hipocâmpais contra a excitotoxicidade induzida pelo kainato em ratos por um mecanismo dependente da ativação de receptores AMPA (SHIH et al., 2004). Também protegeu camundongos do déficit neurológico e reduziu a área total afetada em um modelo de isquemia cerebral de oclusão transiente da artéria cerebral média, demonstrando efeitos anti-inflamatórios e anti-oxidativos (LI et al., 2013).

O tratamento com AU também foi capaz de melhorar o desempenho de camundongos C57/BL6J submetidos a uma dieta com alto teor de lipídeos quando avaliados na esQUIVA inibitória e no labirinto aquático de Morris. Ainda, causou a redução da expressão de marcadores inflamatórios, como CD11b, proteína glial fibrilar ácida, interleucina 2, fator de necrose tumoral- α , ciclooxigenase-2 e óxido nítrico sintase indutível no hipocampo destes animais (LU et al., 2011). Sua suplementação dietética mostrou efeito antidiabético, reduzindo significativamente o nível de glicose no sangue em ratos diabéticos, reestabelecendo a razão glicose/insulina no plasma e os níveis de insulina pancreática em um modelo de animais tratados com streptozotocina e alimentados com uma dieta rica em gordura, propondo um efeito hipoglicemiante e antidiabético (JANG et al., 2009; LEE et

al., 2010).

Em relação ao efeito tipo-antidepressivo do AU, há relatos na literatura da sua presença em diferentes espécies de plantas cujo efeito tipo-antidepressivo foi demonstrado em modelos animais, inclusive correlacionando este efeito à presença deste composto (EMAMGHOREISHI e TALEBIANPOUR, 2009). O AU é um dos componentes majoritários do extrato metanólico de folhas de *Mallotus peltatus*, uma planta endêmica das florestas de Andamão, um arquipélago pertencente à Índia. Os decoctos das folhas desta planta são amplamente utilizados pela tribo local Onge para reduzir a tensão mental e como agente antidepressivo (CHATTOPADHYAY et al., 2003). Ainda, o AU é um dos principais compostos bioativos do extrato de frutas de *Gardenia jasminoides*, o qual exibe significativa inibição das enzimas de degradação de monoaminas MAO-A e MAO-B em fatias de cérebros de ratos *in vitro* (HWANG, 2003). Este extrato, quando administrado oralmente em ratos, causa um aumento significativo dos níveis de 5-HT no tecido cerebral (HWANG e PARK, 2007). Ainda, o AU isolado do extrato de frutas de *Gardenia jasminoides* causou inibição da enzima dopamina- β -hidroxilase, e fraca inibição da enzima MAO-B (KIM, KIM e HWANG, 2012). O AU parece contribuir também na atividade tipo-antidepressiva do extrato de *Melissa officinalis* no TNF (EMAMGHOREISHI e TALEBIANPOUR, 2009), de *Rosmarinus officinalis* no TNF e TSC (MACHADO et al., 2009; MACHADO et al., 2013) e *Eugenia brasiliensis* no TSC (COLLA et al., 2012). Em trabalho prévio realizado por nosso grupo de pesquisa, utilizando o AU isolado de *Rosmarinus officinalis*, foi demonstrado seu efeito tipo-antidepressivo em diferentes testes de avaliação de atividade tipo-antidepressiva de compostos, o TNF e o TSC (MACHADO et al., 2012c). No TSC apresentou efeito tipo-antidepressivo quando coadministrado em doses sub-ativas com SKF38393, agonista de receptores dopaminérgicos do subtipo D_1 , com apomorfina, agonista de receptores dopaminérgicos D_2 , e também com bupropiona, antidepressivo inibidor da recaptação de dopamina. Além disso, teve seu efeito antidepressivo bloqueado pela pré-administração de SCH23390, antagonista de receptores dopaminérgicos D_1 e também de sulpirida, antagonista de receptores dopaminérgicos D_2 , revelando a participação do sistema dopaminérgico em seu efeito tipo-antidepressivo (MACHADO et al., 2012c).

Quadro 3. Diferentes espécies de plantas nas quais o AU está presente e seus usos etnofarmacológicos.

Espécie	Nome Popular	Família	Uso Popular
<i>*Ocimum sanctum</i> L.	Manjeriço Santo	Lamiaceae	Anti-estresse, nervosismo, imunomodulador, anti-inflamatório, analgésico, entre outros.
<i>*Vaccinium myrtillus</i> L.	Mirtilo	Vacciniaceae	Antidiarreico, anti-inflamatório, antibacteriano, entre outros.
<i>Harpagophytum procumbens</i> DC	Garra do Diabo	Pedaliaceae	Analgésico, anti-inflamatório, entre outros.
<i>Sambucus nigra</i> L.	Sabugueiro	Caprifoliaceae	Antigripal e resfriados, antitussígeno, entre outros.
<i>Mentha piperita</i> L.	Hortelã-pimenta	Lamiaceae	Antigripal, descongestionante nasal, analgésico, entre outros.
<i>Vinca minor</i> L.	Congossa	Apocynaceae	Ansiedade, memória, demência, entre outros.
<i>Lavandula augustifolia</i> Mill	Lavanda	Lamiaceae	Ansiedade, nervosismo, sedativo, entre outros.
<i>Origanum vulgare</i> L.	Orégano	Lamiaceae	Antisséptico, anti-inflamatório, entre outros.
<i>Origanum majorana</i> L.	Manjerona	Lamiaceae	Analgésico, antioxidante, antisséptico, entre outros.
<i>Cornus officinalis</i>	Cornélia	Cornaceae	Asma, hepatite, nefrite, entre outros.
<i>Eriobotrya japonica</i>	Nespereita	Rosaceae	Antitussígeno, expectorante, anti-inflamatório, entre outros.
<i>Thymus vulgaris</i> L.	Tomilho	Lamiaceae	Antisséptico, expectorante, vermífugo, entre outros.

<i>Crataegus laevigata</i> (Poir) DC.	Pilriteiro	Rosaceae	Arritmia, hipertensão, entre outros.
<i>Prunus laurocerasus</i> L.	Louro-cerejeiro	Rosaceae	Calmante do SNC.
<i>Arctostaphylos uva-ursi</i>	Uva-de-Urso	Ericaceae	Antisséptico, diurético, entre outros.
<i>Coffea arabica</i>	Café	Rubiaceae	Estimulante
<i>Eucalyptus spp.</i>	Eucalipto	Myrtaceae	Antibacteriano, anti-inflamatório, analgésico, entre outros.
<i>Malus domestica</i>	Maça	Rosaceae	Anti-inflamatório, antidiabético, entre outros.
** <i>Melissa officinalis</i>	Erva-cidreira	Lamiaceae	Calmante, antinevrálgica, entre outros.
<i>Nerium oleander</i>	Oleandro	Apocynaceae	Câncer, dores menstruais, abortiva, entre outros.
<i>Plantago major</i>	Tanchagem	Plantaginaceae	Anti-inflamatório, antidiarreico, entre outros.
* <i>Rosmarinus officinalis</i>	Alecrim	Lamiaceae	Estimulante, antidepressivo, antifebril, entre outros.
<i>Agastache mexicana</i>	Hissopo gigante	Lamiaceae	Ansiedade, distúrbios do sono, entre outros.
*** <i>Gardenia jasminoides</i>	Erva-da-felicidade	Rubiaceae	Bloqueio emocional, irritabilidade, insônia, entre outros.
**** <i>Mallotus peltatus</i>	Pataque	Euphorbiaceae	Antidepressivo, redutor da tensão mental, anti-inflamatório, entre outros.
<i>Nepeta sibthorpii</i>	Erva-dos-gatos (Nepeta)	Lamiaceae	Antisséptico, diurético, entre outros

	spp.)		(<i>Nepeta</i> spp.).
* <i>Eugenia brasiliensis</i> L.	Grumixama	Myrtaceae	Calmanete, antidepressiva, anti-inflamatória, entre outros.

* Plantas cujos extratos apresentaram efeito tipo-antidepressivo em testes pré-clínicos (MAITY et al., 2000; MACHADO et al., 2009; TABASSUM, SIDDIQUI e RIZVI, 2010; CHATTERJEE et al., 2011; COLLA et al., 2012; KUMAR et al., 2012; MACHADO et al., 2012b; TAIWO et al., 2012; MACHADO et al., 2013; SASAKI et al., 2013).

** Atividade inibitória de MAO-A em células PC-12 (LOPEZ et al., 2009).

*** Atividade inibitória de MAO-A e MAO-B e Dopamina β -Hidroxilase em tecido encefálico de ratos (KIM, KIM e HWANG, 2012).

*** Planta cujos decoctos das folhas são usados como agente antidepressivo por humanos.

Fonte: Adaptado de BABALOLA e SHODE, 2013.

2. JUSTIFICATIVA

A depressão é uma das doenças neuropsiquiátricas mais prevalentes, responsável por considerável morbidade psiquiátrica, diminuição do bem estar e perda de produtividade (EBMEIER, DONAGHEY e STEELE, 2006), além de coexistir de maneira elevada com os transtornos de ansiedade (ANGST e DOBLER-MIKOLA, 1985; KESSLER et al., 1997). Desta forma, pode aumentar a gravidade da doença, bem como a incidência de suicídio e contribuir para uma resposta menos efetiva aos tratamentos antidepressivos disponíveis atualmente (BAKISH, 1999; FAVA et al., 2000). Adicionalmente, os fármacos utilizados para o tratamento da depressão apresentam baixa eficácia clínica (NESTLER et al., 2002) e podem causar diversos efeitos colaterais, o que muitas vezes contribui para o abandono do tratamento pelo paciente (BRUNELLO et al., 2002).

O AU possui diversos efeitos biológicos descritos na literatura, dentre eles efeito antioxidante, anti-inflamatório e neuroprotetor, demonstrando assim ser um potencial composto para o estudo na depressão. De fato, um trabalho prévio do nosso grupo, demonstrou seu efeito tipo-antidepressivo em camundongos, o qual parece estar relacionado com uma possível interação com o sistema dopaminérgico (MACHADO et al., 2012c). Porém o AU não possui seus mecanismos de ação antidepressiva totalmente elucidados, não possuindo também trabalhos sobre seu possível potencial ansiolítico.

Desta forma, a importância deste estudo se justifica tendo em vista a elevada prevalência de depressão, a alta taxa de comorbidade ansiedade/depressão, e a necessidade da busca por terapias antidepressivas alternativas ou de substâncias que possam otimizar a eficácia clínica para o tratamento da depressão. Uma vez que o AU possui efeito tipo-antidepressivo demonstrado previamente em camundongos, este trabalho busca aprofundar os conhecimentos a cerca dos mecanismos envolvidos neste efeito bem como investigar sua possível ação ansiolítica, contribuindo na investigação do AU como um possível agente para o tratamento da depressão e também da ansiedade.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Avaliar a participação de diferentes sistemas de neurotransmissores (serotonérgico, noradrenérgico, glutamatérgico e opióide) no efeito tipo-antidepressivo do AU, bem como seu efeito em modelos animais de depressão e de ansiedade.

3.2. Objetivos específicos

- Investigar o envolvimento dos sistemas serotonérgico, noradrenérgico, glutamatérgico e opióide no efeito tipo-antidepressivo do AU no TSC;

- Investigar o efeito da administração de AU em associação com doses sub-efetivas de antidepressivos utilizados na clínica no TSC;

- Investigar o efeito da administração de AU no modelo da depressão induzida pelo estresse crônico imprevisível (ECI) no TSC e no teste de borrifagem de sacarose (TBS);

- Investigar o efeito da administração de AU no modelo da depressão induzida pela administração repetida de corticosterona (CORT) no TSC e no TCS;

- Investigar o efeito da administração repetida de AU nos modelos de depressão induzida pelo ECI e pela CORT sobre os níveis de séricos de corticosterona;

- Investigar o efeito da administração de AU no modelo de depressão induzida pelo estresse imprevisível sobre a expressão gênica (RNAm) de Bcl-2 e Bax.

- Investigar o efeito da administração de AU no modelo de depressão induzida pela CORT sobre os níveis de BDNF no córtex pré-frontal de camundongos;

- Investigar o efeito da administração de AU sobre parâmetros de ansiedade no TCA, teste do labirinto em cruz elevado (LCE), caixa claro/escuro (CCE) e teste de esconder esferas (TEE);

CAPÍTULO 1. SISTEMAS DE NEUROTRANSMISSORES RELACIONADOS AO EFEITO TIPO-ANTIDEPRESSIVO DO ÁCIDO URSÓLICO EM CAMUNDONGOS

Os fármacos antidepressivos disponíveis atualmente no mercado podem atuar em diferentes sistemas de neurotransmissores e desta forma atingir a eficácia clínica (HAMON e BLIER, 2013). A utilização de inibidores triplos de recaptação de monoaminas, os quais inibem a recaptação de 5-HT, NE e DA, tem sido sugerida como uma alternativa mais eficaz para o tratamento da depressão em relação ao uso de antidepressivos inibidores seletivos ou duais de recaptação de monoaminas (LIANG et al., 2008). Similarmente aos antidepressivos, o AU exerce efeito tipo-antidepressivo em testes comportamentais de avaliação de atividade antidepressiva, como o TNF e o TSC, sendo este efeito relacionado à participação do sistema dopaminérgico, como relatado em um trabalho anterior do grupo de pesquisa (MACHADO et al., 2012c). Assim, o objetivo desta primeira etapa foi explorar o putativo envolvimento de outros sistemas de neurotransmissores intimamente ligados à depressão, sendo estes: sistemas serotoninérgico, noradrenérgico, glutamatérgico e opióide.

1.1. Materiais e métodos

1.1.1. Animais

Foram utilizados camundongos Swiss (35-45 g, de aproximadamente 60 dias de idade), de ambos os sexos (homogeneamente distribuídos entre os grupos, n=8), mantidos em condição padrão de biotério (20-22°C), com livre acesso a água e comida, em ciclo claro/escuro de 12:12 horas (luz acessa as 07:00 horas). Os animais foram aclimatizados na sala de experimentação 24 horas antes dos testes comportamentais e os experimentos foram realizados no ciclo claro. Os experimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Catarina (protocolo n° PP00795).

1.1.2. Agentes farmacológicos

Foram utilizados: AU, PCPA, fluoxetina, α -metil- ρ -tirosina (AMPT), NMDA, cetamina, naloxona (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA), MK-801 (RBI, Natick, MA, USA) e reboxetina (Pfizer, SP,

Brasil). O AU foi dissolvido em água destilada com 10% de Tween 80. Fluoxetina, reboxetina e MK-801 em água destilada. PCPA, NMDA, cetamina e naloxona em solução salina (NaCl 0,9%) e AMPT em solução salina com 10% de Tween 80.

1.1.3. Teste de suspensão pela cauda (TSC)

Os camundongos foram suspenso pela cauda 50 cm acima por uma fita adesiva presa cerca de 1 cm a partir da ponta da cauda. A duração total da imobilidade (ausência de movimento ou movimentação passiva) foi registrada durante um período de 6 minutos, sendo uma diminuição do tempo de imobilidade considerada um efeito tipo-antidepressivo (Figura 1.1) (STERU et al., 1985).

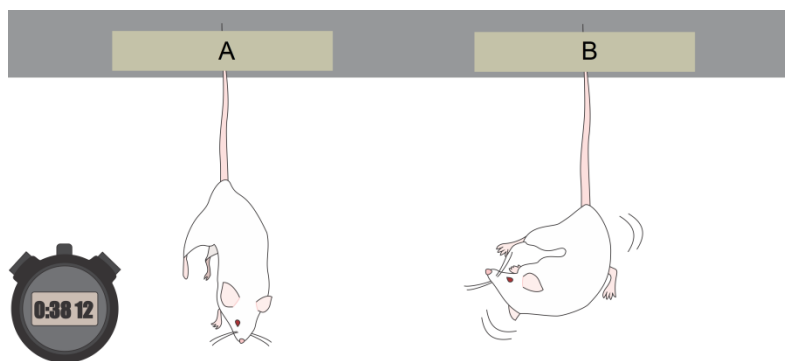


Figura 1. 1. Teste de suspensão pela cauda (TSC).

O camundongo é suspenso acima do chão pela cauda, preso a uma fita. Pelo período de 6 minutos é contabilizado o tempo de imobilidade (A). Quando o camundongo está realizando movimentos voluntários não se registra o tempo (B). Fonte: Do autor.

1.1.4. Teste do campo aberto (TCA)

Para descartar a possibilidade de que uma alteração no tempo de imobilidade dos camundongos no TSC possa ter sido causada devido a uma alteração na atividade locomotora dos animais, os camundongos foram analisados no TCA. Foi utilizada uma caixa de madeira (40 × 60 × 50 cm), com 12 quadrantes iguais representados no piso (Figura 1.2). O número de cruzamentos de quadrantes realizados pelos camundongos foi contabilizado por um período de 6 minutos. O piso do aparato foi limpo com uma solução de álcool 10% entre os testes (RODRIGUES et al., 2002).

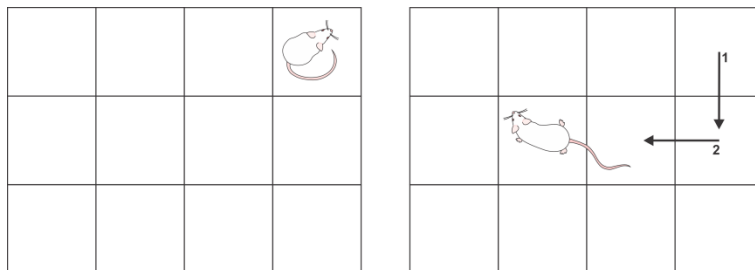


Figura 1. 2. Teste do campo aberto (TCA).

O camundongo é colocado em uma caixa e durante o período de 6 minutos é contabilizado o número de quadrantes cruzados como parâmetro de locomoção. Fonte: Do autor.

1.1.5. Tratamentos farmacológicos

Para verificar um possível envolvimento do sistema serotoninérgico no efeito tipo-antidepressivo do AU, os camundongos foram administrados com PCPA (100 mg/kg, i.p.), um inibidor da enzima triptofano hidroxilase, envolvida na síntese de 5-HT, por 4 dias consecutivos. Trinta minutos após a última administração de PCPA foi administrado AU (0,1 mg/kg, p.o.) e decorridos 60 minutos os camundongos foram submetidos aos testes comportamentais. Em outra série de experimentos, foi avaliado o efeito combinado da administração de uma dose sub-efetiva de AU (0,001 mg/kg, p.o.) com uma dose sub-efetiva de fluoxetina (5 mg/kg, p.o.), 60 minutos após a administração. A dose sub-efetiva de fluoxetina foi previamente selecionada pela administração de diferentes doses (5 e 10 mg/kg, p.o.) e posterior avaliação comportamental no TSC e TCA 60 minutos após a administração.

A fim de verificar o papel do sistema noradrenérgico no efeito tipo-antidepressivo do AU os camundongos foram administrados com AMPT (100 mg/kg, i.p.), um inibidor da enzima tirosina hidroxilase, envolvida na síntese de NE e DA. Após 4 horas foi administrado AU (0,1 mg/kg, p.o.) e decorridos 60 minutos os camundongos foram submetidos aos testes comportamentais. Ainda, o efeito da administração combinada de uma dose sub-efetiva de AU (0,001 mg/kg, p.o.) com uma dose sub-efetiva de reboxetina (2 mg/kg p.o.), um antidepressivo ISRN, também foi avaliado 60 minutos após a administração. A dose sub-efetiva de reboxetina foi previamente selecionada pela administração de diferentes doses (2 e 20 mg/kg, p.o.)

e posterior avaliação comportamental no TSC e TCA 60 minutos após a administração.

Para avaliar a participação do sistema glutamatérgico no efeito tipo-antidepressivo do AU, os camundongos foram tratados com AU (0,1 mg/kg, p.o.) e após 45 minutos foi administrado NMDA (0,1 pmol/mouse, i.c.v.), um agonista seletivo de receptores NMDA. Após 15 minutos os animais foram submetidos aos testes comportamentais. Em outra série de experimentos, camundongos foram administrados com uma dose sub-efetiva de AU (0,001 mg/kg, p.o.) e após 30 minutos foram administrados com uma dose sub-efetiva de cetamina (0,1 mg/kg, i.p.), um antagonista de receptores NMDA, sendo avaliados nos testes comportamentais após 30 minutos. Também foi investigada a administração combinada de uma dose sub-efetiva de AU (0,001 mg/kg, p.o.) com uma dose sub-efetiva de MK-801 (0,001 mg/kg, p.o.), um antagonista de receptores NMDA. Sessenta minutos após a administração dos agentes farmacológicos foram realizados os testes comportamentais.

O envolvimento do sistema opióide foi verificado pela administração de naloxona (1 mg/kg, i.p.), um antagonista não seletivo de receptores opióides, seguida, após 15 minutos, da administração de AU (0,1 mg/kg, p.o.) e avaliação comportamental após 60 minutos.

Os agentes foram administrados em um volume de 10 ml/kg de peso corporal, exceto NMDA, administrado via i.c.v. (5 µl/camundongo). A dose de NMDA utilizada foi selecionada baseada em estudos prévios que realizaram uma curva dose-resposta, não tendo apresentado nenhum sinal de toxicidade aparente nem alterações locomotoras. Os grupos controle receberam veículo apropriado. As vias de administração e doses utilizadas neste estudo, incluindo a dose ativa e sub-efetiva do AU, foram baseadas em estudos prévios do nosso laboratório e da literatura que confirmam a eficácia dos protocolos acima descritos (MACHADO et al., 2008; BETTIO et al., 2012; MACHADO et al., 2012c; BERROCOSO et al., 2013; CUNHA et al., 2013).

1.1.6. Administração i.c.v.

A administração i.c.v. foi realizada com a utilização de uma micro seringa (25 µl, Hamilton) conectada a uma agulha de aço inoxidável de 26-gauge, inserida perpendicularmente 2 milímetros de profundidade através do crânio dos camundongos (LAURSEN e BELKNAP, 1986). Os animais foram levemente anestesiados com éter (apenas o necessário para a perda do reflexo postural) e em seguida

contidos delicadamente para injeção i.c.v.. A esterilização dos materiais foi realizada utilizando gaze com etanol a 70%. A agulha foi inserida unilateralmente (1 mm) no ponto médio equidistante entre os olhos, a uma distância igual entre os olhos e os ouvidos e perpendicular ao plano do crânio. Um volume de 5 μ l de solução salina estéril (veículo) ou droga (dissolvida em solução salina estéril) foi injetado diretamente no ventrículo lateral esquerdo. Os camundongos exibiram comportamento normal em um período de 1 minuto após a injeção (CUNHA et al., 2013).

1.1.7. Análise estatística

Os resultados foram analisados por análise de variância (ANOVA) de uma ou duas vias, seguida de teste post hoc de Newman-Keuls quando apropriado. Foram considerados significativos valores de $p < 0,05$.

1.2. Resultados

1.2.1. Envolvimento do sistema serotoninérgico no efeito tipo-antidepressivo do AU no TSC

A Figura 1.3A demonstra que o AU (0,1 mg/kg) possui efeito tipo-antidepressivo no TSC uma vez que é capaz de diminuir o tempo de imobilidade em relação o grupo controle. Ainda, o tratamento com PCPA, impediu a diminuição do tempo de imobilidade do AU. Nenhum tratamento causou alterações no parâmetro de locomoção no TCA (Figura 1.3B). A ANOVA de duas vias revelou efeito significativo para o tratamento com AU [F (1,28)=10,17, $p < 0,01$], mas não para o tratamento com PCPA [F (1,28)=1,97, $p = 0,17$] ou interação AU x PCPA [F (1,28)=2,57, $p = 0,12$] para o tempo de imobilidade no TSC. A ANOVA não revelou efeito significativo para o tratamento com AU [F (1,28)=0,04, $p = 0,84$], PCPA [F (1,28)=0,45, $p = 0,51$] ou interação AU x PCPA [F (1,28)=0,30, $p = 0,59$] para o número de cruzamentos no TCA.

As Figuras 1.3C e D mostram o efeito da fluoxetina (5–10 mg/kg, p.o.) no TSC e TCA, respectivamente. A ANOVA de uma via mostrou um efeito significativo do tratamento [F(2,21)=18,08, $p < 0,01$] para o tempo de imobilidade no TSC e nenhum efeito significativo [F(2,21)=0,52, $p = 0,60$] para o número de cruzamentos no TCA. O teste post-hoc revelou que apenas os animais tratados com a dose de 10 mg/kg de fluoxetina apresentaram uma redução significativa no tempo de imobilidade no TSC. Baseado nestes resultados, a dose de 5 mg/kg

de fluoxetina foi selecionada como dose sub-efetiva para ser usada em associação com a dose sub-efetiva de AU em experimentos posteriores.

A Figura 1.3E mostra que a administração conjunta de doses sub-efetivas de AU (0,001 mg/kg, p.o.) com fluoxetina (5 mg/kg, p.o.), foi capaz de produzir um efeito tipo-antidepressivo no TSC, sem causar alterações na atividade locomotora dos camundongos no TCA (Fig. 1.3F). A ANOVA de duas vias mostrou um efeito significativo para o tratamento com AU [F (1,28)=5,70, p<0,05], fluoxetina [F (1,28)=7,92, p<0,01] e para a interação AU x fluoxetina [F (1,28)=4,72, p<0,05] para o TSC. A ANOVA de duas vias não demonstrou efeito para o tratamento com AU [F (1,28)=0,52, p=0,48], fluoxetina [F (1,28)=0,0008, p=0,98] ou interação AU x fluoxetina [F (1,28)=0,02, p=0,89] para o TCA.

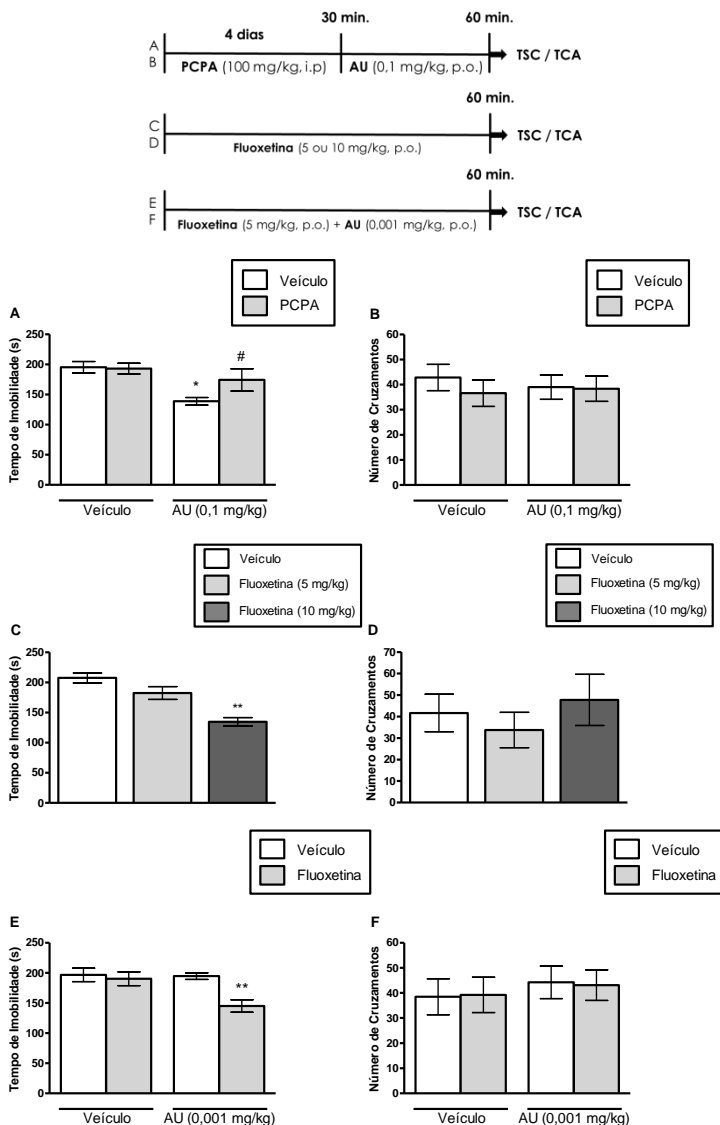


Figura 1.3. Envolvimento do sistema serotoninérgico no efeito tipo-antidepressivo do AU no TSC.

Efeito do pré-tratamento com PCPA (100 mg/kg, i.p., 4 dias) em prevenir o efeito tipo-antidepressivo do AU no TSC (A) na atividade locomotora no TCA (B). Efeito da administração de fluoxetina (5-10

mg/kg, p.o.) no TSC (C) e no TCA (D). Efeito da coadministração de doses sub-efetivas de AU (0,001 mg/kg) com fluoxetina (5 mg/kg) no TSC e no TCA (F). Os valores estão expressos como média \pm E.P.M. (n=8). * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ quando comparado ao veículo, # $p < 0,05$ quando comparado ao grupo AU. ANOVA de duas vias para os painéis A, B, E e F, e ANOVA de uma via para os painéis C e D, seguidas de teste post hoc de Newman-Keuls.

1.2.2. Envolvimento do sistema noradrenérgico no efeito tipo-antidepressivo do AU no TSC

Os resultados apresentados na Figura 1.4A mostram que o pré-tratamento com AMPT foi capaz de prevenir o efeito tipo-antidepressivo do AU no TSC. A Figura 1.4B mostra que nenhuma das administrações utilizadas causou alteração da atividade locomotora dos camundongos no TCA. A ANOVA de duas vias mostrou efeito significativo para o tratamento com AU [F (1,28)=19,87, $p < 0,01$], AMPT [F (1,28)=23,80, $p < 0,01$] e interação AU x AMPT [F (1,28)=17,57, $p < 0,01$] para o TSC e nenhum efeito significativo para o tratamento com AU [F (1,28)=0,09, $p = 0,76$], AMPT [F (1,28)=0,06, $p = 0,81$] ou interação AU x AMPT [F (1,28)=0,83, $p = 0,37$] para o TCA.

As Figuras 1.4C e D mostram o efeito da reboxetina (2–20 mg/kg, p.o.) no TSC e TCA, respectivamente. A ANOVA de uma via mostrou um efeito significativo do tratamento [F(2,21)=62,38, $p < 0,01$] para o tempo de imobilidade no TSC e nenhum efeito significativo [F(2,21)=0,34, $p = 0,72$] para o número de cruzamentos no TCA. A análise de post-hoc revelou que apenas os animais tratados com a dose de 20 mg/kg de reboxetina tiveram uma redução significativa no tempo de imobilidade no TSC. Baseada nestes resultados a dose de 2 mg/kg de reboxetina foi selecionada como dose sub-efetiva para ser usada em associação com a dose sub-efetiva de AU.

Os resultados da Figura 1.4E mostram que a administração conjunta de doses sub-efetivas de AU (0,001 mg/kg, p.o.) com reboxetina (2 mg/kg, p.o.) foi capaz de produzir um efeito tipo-antidepressivo no TSC sem causar alterações na locomoção avaliada no TCA (Figura 1.4F). A ANOVA de duas vias mostrou um efeito significativo para o tratamento com AU [F (1,28)=4,41, $p < 0,05$], reboxetina [F (1,28)=5,20, $p < 0,05$] e interação AU x reboxetina [F (1,28)=4,64, $p < 0,05$] para o TSC e nenhum efeito significativo para o tratamento com AU [F (1,28)=0,17, $p = 0,68$], reboxetina [F (1,28)=0,42, $p = 0,52$] e interação AU x reboxetina [F (1,28)=0,27, $p = 0,61$] para o TCA.

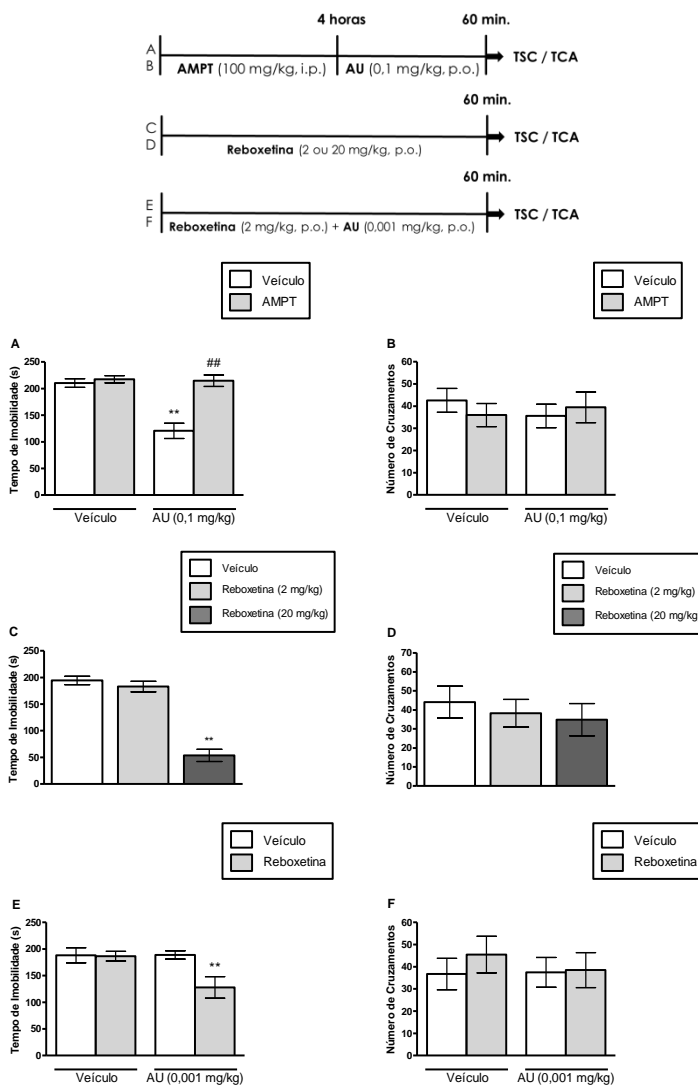


Figura 1. 4. Envolvimento do sistema noradrenérgico no efeito tipo-antidepressivo do AU no TSC.

Pré-tratamento com AMPT prevenindo o efeito tipo-antidepressivo do AU no TSC (A) e na atividade locomotora no TCA (B). Efeito da administração de reboxetina (2-20 mg/kg, p.o.) no TSC (C) e no TCA (D). Efeito da coadministração de doses sub-efetivas de AU (0,001

mg/kg) com reboxetina (2 mg/kg) no TSC e no TCA (F). Os valores estão expressos como média \pm E.P.M. (n=8). ** $p < 0,01$ quando comparado ao veículo, ## $p < 0,01$ quando comparado ao grupo AU. ANOVA de duas vias para os painéis A, B, E e F, e ANOVA de uma via para os painéis C e D, seguidas de teste post hoc de Newman-Keuls.

1.2.3. Envolvimento do sistema glutamatérgico no efeito tipo-antidepressivo do AU no TSC

A Figura 1.5A mostra que o tratamento com NMDA (0,1 pmol/camundongo, i.c.v.) não foi capaz de prevenir o efeito tipo-antidepressivo do AU no TSC. Ainda, nenhum dos tratamentos causou alteração na atividade locomotora dos camundongos (Figura 1.5B). A ANOVA de duas vias mostrou um efeito significativo para o tratamento com AU [F (1,28)=29,31, $p < 0,01$], mas não para o tratamento com NMDA [F (1,28)=0,0015, $p = 0,97$] ou interação AU x NMDA [F (1,28)=0,29, $p = 0,60$] para o TSC e nenhum efeito significativo para o tratamento com AU [F (1,28)=0,55, $p = 0,46$], NMDA [F (1,28)=0,10, $p = 0,75$] ou interação AU x NMDA [F (1,28)=0,05, $p = 0,83$] para o TCA.

Os resultados apresentados na Figura 1.5C mostram que o tratamento com uma dose sub-efetiva de cetamina (0,1 mg/kg, i.p.) não foi capaz de potencializar o efeito de uma dose sub-efetiva de AU (0,001 mg/kg, p.o.) no TSC, assim como não alterou a atividade locomotora no TCA (Figura 1.5D). A ANOVA de duas vias não mostrou efeito significativo para o tratamento com AU [F (1,28)=0,02, $p = 0,90$], cetamina [F (1,28)=0,56, $p = 0,46$] ou interação AU x cetamina [F (1,28)=0,14, $p = 0,71$] para o TSC e também para o tratamento com AU [F (1,28)=0,11, $p = 0,74$], cetamina [F (1,28)=0,28, $p = 0,60$] ou interação AU x cetamina [F (1,28)=0,53, $p = 0,47$] para o TCA. Da mesma maneira, a Figura 1.5E mostra que o tratamento com uma dose sub-efetiva de MK-801 (0,001 mg/kg, p.o.) não foi capaz de potencializar o efeito de uma dose sub-efetiva de AU (0,001 mg/kg, p.o.) no TSC e não alterou a atividade locomotora no TCA (Figura 1.5F). A ANOVA de duas vias não demonstrou efeito significativo para o tratamento com AU [F (1,28)=0,0002, $p = 0,99$], MK-801 [F (1,28)=0,39, $p = 0,54$] ou interação AU x MK-801 [F (1,28)=0,05, $p = 0,82$] para o TSC e também não para o tratamento com AU [F (1,28)=0,08, $p = 0,78$], MK-801 [F (1,28)=0,27, $p = 0,61$] ou AU x MK-801 [F (1,28)=0,02, $p = 0,89$] para o TCA.

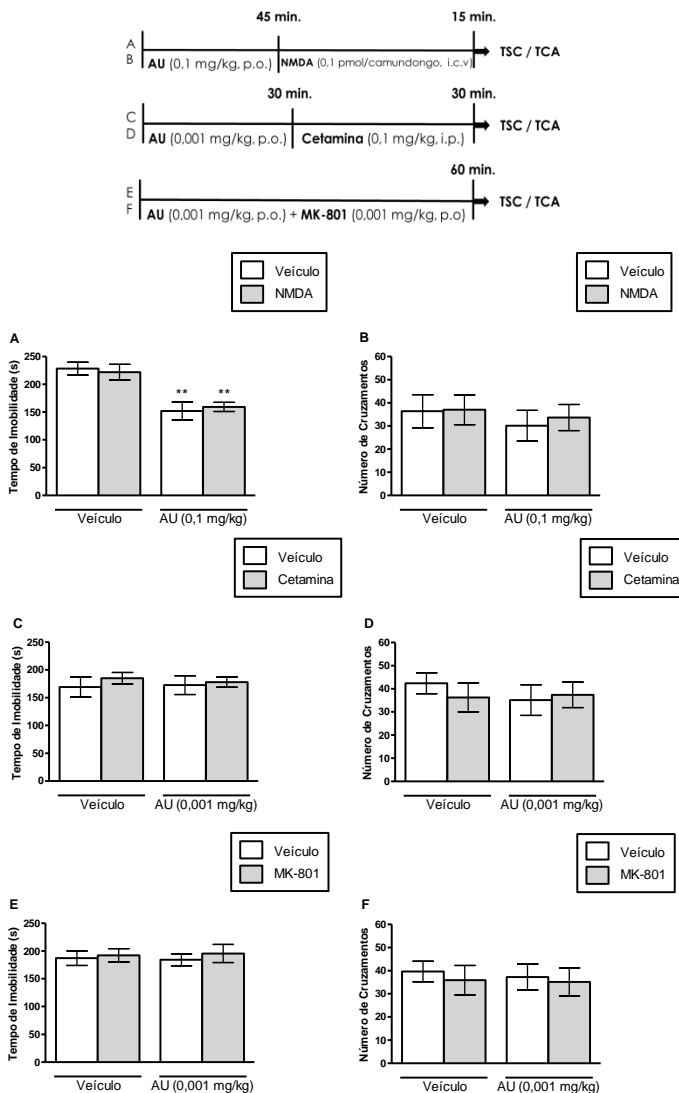


Figura 1.5. Envolvimento do sistema glutamatérgico no efeito tipo-antidepressivo do AU no TSC.

Efeito do tratamento com NMDA no efeito tipo-antidepressivo induzido pelo AU no TSC (A) e no TCA (B). Efeito do tratamento com doses sub-efetivas de AU (0,001 mg/kg) e cetamina, ou MK-801 no TSC (C e E) e no TCA (D e F). Os valores estão expressos em média \pm E.P.M. **

$p < 0,01$ quando comparado ao veículo. ANOVA de duas vias seguida de teste post hoc de Newman-Keuls.

1.2.4. Envolvimento do sistema opióide no efeito tipo-antidepressivo do AU no TSC

Os resultados apresentados na Figura 1.6A mostram que o pré-tratamento com naloxona não foi capaz de prevenir o efeito tipo-antidepressivo do AU no TSC. Nenhum tratamento causou alteração da atividade locomotora dos camundongos (Figura 1.6B). A ANOVA de duas vias mostrou efeito significativo para o tratamento com AU [F (1,28)=18,97, $p < 0,01$], mas não para naloxona [F (1,28)=0,0021, $p = 0,96$] ou interação AU x naloxona [F (1,28)=0,75, $p = 0,39$] para o TSC. Nenhum efeito significativo foi encontrado para o tratamento com AU [F (1,28)=0,23, $p = 0,63$], naloxona [F (1,28)=0,11, $p = 0,74$] e interação AU x naloxona [F (1,28)=0,30, $p = 0,59$] para o TCA.

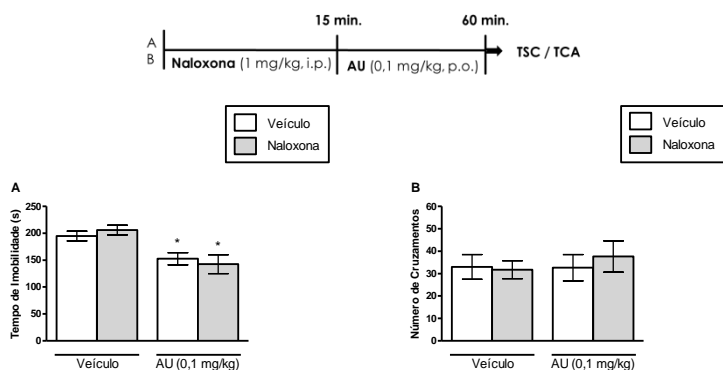


Figura 1. 6. Envolvimento do sistema opióide no efeito tipo-antidepressivo do AU no TSC.

Efeito do pré-tratamento com naloxona no efeito tipo-antidepressivo do AU no TSC (A) e no TCA (B). Os valores estão expressos em média \pm E.P.M. * $p = 0,05$ quando comparado ao veículo. ANOVA de duas vias seguida de teste post hoc de Newman-Keuls.

1.3. Discussão

Os resultados apresentados neste estudo mostram o envolvimento dos sistemas serotoninérgico e noradrenérgico, mas não dos sistemas glutamatérgico e opióide, no efeito tipo-antidepressivo do AU no TSC. O TSC é um teste comportamental bem validado para a avaliação da atividade tipo-antidepressiva de compostos e também para a avaliação dos mecanismos envolvidos na depressão (STERU et al., 1985; CRYAN, MOMBÉREAU e VASSOUT, 2005). Neste teste, os camundongos são submetidos a uma situação inescapável desenvolvendo uma postura imóvel, sendo que a administração de antidepressivos e também de compostos com efeito tipo-antidepressivo promove um comportamento de tentativa de escape e consequente diminuição do tempo total de imobilidade do animal durante o teste (CRYAN, MOMBÉREAU e VASSOUT, 2005). Para descartar a possibilidade de que uma redução no tempo total de imobilidade dos animais possa ter ocorrido devido a um aumento na atividade locomotora, os animais são submetidos ao TCA, o qual avalia a locomoção espontânea do animal (RODRIGUES et al., 1996; RODRIGUES et al., 2002). Neste trabalho nenhum dos tratamentos realizados causaram alterações na locomoção espontânea no TCA dos animais, indicando desta forma que os resultados obtidos no TSC não estão diretamente relacionados a uma possível alteração da atividade locomotora.

Diferentes trabalhos demonstram que extratos de plantas que possuem o AU como um dos seus principais constituintes, como *Rosmarinus officinalis* e *Eugenia brasiliensis*, apresentam um efeito tipo-antidepressivo relacionado com a participação do sistema monoaminérgico (COLLA et al., 2012; MACHADO et al., 2012b; MACHADO et al., 2013). Ainda, o AU é um dos principais constituintes do extrato de frutas de *Gardenia jasminoides*, o qual apresentou atividade inibitória das enzimas MAO-A e MAO-B e também aumentou a concentração de 5-HT em tecido cerebral de ratos (HWANG, 2003; HWANG e PARK, 2007). Quando isolado de *Gardenia jasminoides*, o AU exibiu fraca inibição de MAO-B e significativainibição de dopamina- β -hidroxilase, uma enzima limitante na síntese de NE e DA (KIM, KIM e HWANG, 2012). De fato, em trabalho prévio do nosso grupo, foi demonstrado o efeito tipo-antidepressivo do AU no TSC, bem como a participação do sistema dopaminérgico, sugerindo uma ativação dos receptores dopaminérgicos D₁ e D₂ neste efeito (MACHADO et al., 2012c).

Diversos estudos indicam que as monoaminas (5-HT, NE e DA) possuem um papel importante na etiologia da depressão e nos efeitos de diferentes terapias antidepressivas (ELHWUEGI, 2004; HAMON e BLIER, 2013). De acordo, os mecanismos de ação dos antidepressivos comercialmente disponíveis envolvem o aumento da biodisponibilidade de monoaminas no cérebro e este aumento está diretamente ligado a eficácia terapêutica dos fármacos (BLIER, 2001; HAMON e BLIER, 2013). Além disso, estudos realizados durante os últimos 30 anos demonstram a existência de interações funcionais entre os sistemas serotoninérgico, noradrenérgico e dopaminérgico, incluindo na depressão e na terapia antidepressiva (HAMON e BLIER, 2013).

Uma importante estratégia farmacológica para a investigação de compostos com efeito tipo-antidepressivo baseia-se na depleção de monoaminas, a qual permite avaliar a participação de diferentes sistemas de neurotransmissores na atividade destes compostos (O'LEARY et al., 2007). Neste sentido, foi utilizado o PCPA, um inibidor seletivo da enzima triptofano hidroxilase, uma enzima limitante na biossíntese de 5-HT, como ferramenta farmacológica para depletar os níveis de 5-HT cerebral (KOE e WEISSMAN, 1966; O'LEARY et al., 2007). A administração de PCPA foi capaz de prevenir completamente o efeito tipo-antidepressivo do AU no TSC, indicando que este efeito é dependente da disponibilidade de 5-HT na fenda sináptica. Reforçando esta hipótese, demonstramos que a administração conjunta de doses sub-efetivas de AU com fluoxetina, antidepressivo ISRS, produziram uma resposta antidepressiva não alcançada pelo tratamento com somente um dos compostos. De acordo, diversas evidências demonstram que a terapia antidepressiva pode ter sua efetividade devido a um aumento da neurotransmissão serotoninérgica (NEMEROFF e OWENS, 2002; ELHWUEGI, 2004; HAMON e BLIER, 2013).

Diversos estudos experimentais e clínicos também demonstram um papel fundamental do sistema noradrenérgico na etiologia da depressão e compostos que atuam neste sistema tem sido extensivamente estudados e utilizados na prática clínica (NEMEROFF e OWENS, 2002; ELHWUEGI, 2004; DELL'OSSO et al., 2011; HAMON e BLIER, 2013). Neste sentido, a utilização do AMPT, um inibidor da síntese de NE e DA, torna-se uma importante ferramenta para o estudo da participação destes neurotransmissores no efeito tipo-antidepressivo de compostos. De acordo, dados clínicos demonstram que o AMPT pode causar um aumento nos sintomas depressivos na escala de depressão de Hamilton (MILLER et al., 1996). Nossos resultados demonstram que a administração de AMPT impediu o efeito

tipo-antidepressivo do AU no TSC. Estes resultados podem ser relacionados a redução da biodisponibilidade de NE e/ou DA a nível central (MAYORGA et al., 2001). Para avaliar de maneira mais direta a participação do sistema noradrenérgico no efeito do AU, avaliamos a administração conjunta de AU com reboxetina, antidepressivo ISRN. O efeito tipo-antidepressivo demonstrado neste protocolo experimental indica e reforça a participação do sistema noradrenérgico no efeito tipo-antidepressivo do AU no TSC.

Além do sistema monoaminérgico, outros sistemas de neurotransmissores têm sido relacionados à depressão. Diversos estudos demonstram o envolvimento do sistema glutamatérgico na fisiopatologia dos transtornos de humor, bem como a capacidade de antagonistas de receptores NMDA produzirem efeitos antidepressivos (TRULLAS e SKOLNICK, 1990; LAYER et al., 1995; ZARATE et al., 2013). Os resultados deste estudo demonstram que o tratamento dos camundongos com NMDA, agonista de receptores NMDA, não foi capaz de prevenir o efeito tipo-antidepressivo do AU no TSC, sugerindo que o AU não exerce efeito tipo-antidepressivo relacionado a um antagonismo dos receptores NMDA. Corroborando com esta conclusão, o tratamento com doses sub-efetivas de MK-801, bem como de cetamina, antagonistas de receptores NMDA, em conjunto com AU, não foi capaz de promover uma diminuição do tempo de imobilidade dos camundongos no TSC, reforçando assim que o efeito tipo-antidepressivo do AU não é mediado por uma modulação dos receptores NMDA.

Outro sistema de neurotransmissor envolvido nos transtornos de humor é o sistema opióide. Evidências farmacológicas, neuroquímicas e comportamentais suportam esta hipótese (PICKAR et al., 1980; MANSOUR et al., 1988; TEJEDOR-REAL et al., 1995). Neste sentido, ensaios clínicos indicam efeito antidepressivo de opióides como β -endorfina e buprenorfina (DARKO et al., 1992; BODKIN et al., 1995) e diminuição da atividade opióide endógena em pacientes depressivos (PICKAR et al., 1980). Como ferramenta farmacológica, a naloxona, um antagonista de receptores opióides, pode ser utilizada em estudos pré-clínicos para investigar a participação do sistema opióide na atividade de compostos, podendo bloquear o efeito tipo-antidepressivo de compostos que interagem com este sistema (KASTER et al., 2007; GONCALVES et al., 2012; BERROCOSO et al., 2013). Neste trabalho a administração de naloxona não foi capaz de prevenir o efeito tipo-antidepressivo do AU no TSC, sugerindo que o sistema opióide não está envolvido no efeito do AU. A literatura demonstra interações entre os sistemas opióide e glutamatérgico em diferentes áreas cerebrais

(COUTINHO-NETTO, ABDUL-GHANI e BRADFORD, 1980; HILL e BROTHIE, 1995). De fato, a inibição de receptores NMDA pode aumentar os níveis de opióides endógenos no SNC (MAZE e FUJINAGA, 2000), e assim, antagonistas de receptores opióides constituem-se em ferramentas farmacológicas para a busca de compostos que bloqueiam a hiperatividade glutamatérgica, (SCHROEDER et al., 1998) e conseqüentemente para a investigação de compostos que interagem com o sistema glutamatérgico (BROCARD et al., 2009). De acordo com essa hipótese, neste trabalho nem a administração de agonista de receptores NMDA (NMDA) ou de antagonista de receptores opióides (naloxona) foi capaz de bloquear o efeito tipo-antidepressivo do AU no TSC.

Os resultados apresentados no presente estudo sugerem que o efeito tipo-antidepressivo do AU no TSC envolve a participação dos sistemas serotoninérgico e noradrenérgico. Estes resultados, em conjunto com resultados de um trabalho prévio do nosso grupo, que demonstra o envolvimento do sistema dopaminérgico no efeito do AU (MACHADO et al., 2012c), contribuem para a hipótese de que os níveis de monoaminas centrais estão envolvidos na resposta tipo-antidepressiva do AU. Estes dados são consistentes com a hipótese de que os sistemas serotoninérgico, noradrenérgico e dopaminérgico contribuem para a eficácia da terapia antidepressiva (HAMON e BLIER, 2013). Dados sugerem que os antidepressivos mais comumente prescritos atuam aumentando a disponibilidade de 5-HT ou NE, de maneira seletiva ou não (SHAW et al., 2007), contudo os antidepressivos que atuam seletivamente em um único sistema de neurotransmissor levam a uma diminuição dos sintomas depressivos em uma porcentagem limitada de pacientes e parecem ser menos efetivos em prevenir a recorrência dos sintomas (HAMON e BLIER, 2013). Desta forma, uma estratégia crescente no desenvolvimento de novos tratamentos antidepressivos é a utilização de inibidores triplos de recaptção de monoaminas, os quais inibem a recaptção de 5-HT, NE e DA e têm sido sugeridos como terapias mais eficazes e que necessitam de menos tempo de tratamento para produzir efeito terapêutico quando comparados aos antidepressivos inibidores seletivos ou duais de recaptção de monoaminas (LIANG et al., 2008). Neste sentido, o AU pode ser considerado como um agente antidepressivo de grande interesse na busca por uma resposta mais rápida ao tratamento, remissão dos sintomas e melhora da qualidade de vida dos pacientes depressivos, uma vez que parece exercer efeito tipo-antidepressivo dependente da modulação dos sistemas serotoninérgico, noradrenérgico e dopaminérgico. Além disso, o efeito somatório

encontrado quando administrado em conjunto com bupropiona (MACHADO et al., 2012c), fluoxetina e reboxetina (neste trabalho), sugerem que este composto pode também potencializar a efetividade dos antidepressivos disponíveis no mercado. Considerando estes fatos, em conjunto com o efeito neuroprotetor do AU relatado em outros estudos (HONG, JEONG e JUN, 2012; LI et al., 2013) e o perfil farmacológico seguro deste composto (AGGARWAL, TAKADA e OOMMEN, 2004), o AU pode ser considerado um composto de interesse em futuras investigações para o tratamento da depressão.

Este capítulo originou o Artigo: Colla, A.R.; Oliveira. A.; Pazini F.L.; Rosa, J.M.; Manosso, L.M.; Cunha, M.P.; Rodrigues, A.L. Serotonergic and noradrenergic systems are implicated in the antidepressant-like effect of ursolic acid in mice. *Pharmacol Biochem Behav*, v. 124, p. 108-16, 2014.

CAPÍTULO 2. A ADMINISTRAÇÃO DE ÁCIDO URSÓLICO PROTEGE CONTRA O COMPORTAMENTO TIPO-DEPRESSIVO INDUZIDO PELO ESTRESSE CRÔNICO IMPREVISÍVEL EM CAMUNDONGOS

Diferentes trabalhos sustentam a hipótese de que a depressão está fortemente associada com o estresse. Eventos estressantes durante a vida parecem aumentar o risco para o desencadeamento da depressão e serem responsáveis por até 80% dos casos da doença (BROWN e HARRIS, 1978; HAMMEN, 2005). Um dos protocolos de estresse mais utilizados para a pesquisa pré-clínica com depressão é o protocolo do ECI, considerado efetivo em induzir comportamento tipo-depressivo em animais e consequentemente para a investigação de compostos com efeito tipo-antidepressivo (ANISMAN e MATHESON, 2005). No ECI, os animais são submetidos a diferentes estressores por um determinado período de tempo (14 dias neste trabalho) e ao final do protocolo apresentam um comportamento tipo-depressivo em diferentes testes comportamentais, assim como alterações na expressão gênica de proteínas pró-apoptóticas e anti-apoptóticas em diferentes regiões encefálicas relacionadas a depressão, como o hipocampo (LU et al., 2006; KOSTEN et al., 2008; WANG, Y. et al., 2011; MORETTI et al., 2012; DING et al., 2014; YU et al., 2014).

Uma vez que o AU apresenta efeito tipo-antidepressivo em diferentes testes preditivos de atividade tipo-antidepressiva (TSC e TNF) e considerando que o estresse crônico é um fator fortemente associado à depressão, o objetivo do trabalho apresentado neste capítulo foi investigar pela primeira vez se o tratamento repetido com AU seria capaz de proteger contra as alterações comportamentais (comportamento tipo-depressivo) induzidas pelo ECI em camundongos, bem como verificar os níveis séricos de corticosterona e de RNAm das proteínas envolvidas na sobrevivência (Bcl-2) e na morte celular (Bax) no hipocampo destes animais.

2.1. Materiais e métodos

2.1.1. Animais

Foram utilizados camundongos Swiss machos (40-45 g, de aproximadamente 60 dias de idade) mantidos sob condições padrão de biotério (ver item 4.1.1.), aclimatizados na sala de experimentação 24 horas antes dos testes comportamentais. Os experimentos, aprovados

pela CEUA da UFSC (protocolo n° PP00795), foram realizados durante o ciclo claro, sendo gravados e avaliados por experimentador que desconhecia os grupos experimentais, utilizando grupos independentes de animais (n=8 para os testes comportamentais, n=6 para dosagem de corticosterona e n=3 para qRT-PCR no hipocampo).

2.1.2. Ferramentas farmacológicas e tratamento

O AU (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA) foi dissolvido em água destilada com 10% de Tween 80 e fluoxetina em água destilada. Ambos foram administrados oralmente em um volume constante de 10 ml/kg, AU em uma dose de 0,1 mg/kg e fluoxetina em uma dose de 10 mg/kg por peso corporal e os grupos controle receberam veículo apropriado, uma vez por dia durante os últimos 7 dias do ECI (Figura 2.1). Para este trabalho os animais foram divididos em 6 grupos: (1) não-estressados + veículo; (2) não-estressados + AU; (3) não-estressados + fluoxetina; (4) estressados + veículo; (5) estressados + AU; (6) estressados + fluoxetina.

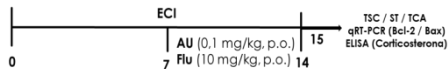


Figura 2. 1. Protocolo experimental.

O ECI possui duração de 14 dias. Do sétimo ao décimo quarto dia os animais foram tratados com AU ou fluoxetina. No décimo quinto dia de protocolo os camundongos foram submetidos aos testes comportamentais bem como tiveram o hipocampo e soro coletados para análises posteriores.

2.1.3. Procedimento experimental

O protocolo do ECI foi constituído por diferentes estressores aplicados em diferentes horários pelo período de 14 dias (Quadro 1), de acordo com estudos prévios (LU et al., 2006). Durante o período do protocolo, os animais controles foram mantidos em suas caixas. No décimo quinto dia, 24 horas após o ultimo tratamento farmacológico, os animais foram submetidos aos testes comportamentais, TSC, TCA ou teste de borrifagem de sacarose (TBS).

Quadro 4. Protocolo de comportamento tipo-depressivo induzido pelo protocolo do estresse imprevisível.

Dia	Agente	Horário
1	Confinamento (1.5h)	14:00h
2	Banho frio (15°C – 5 min.)	09:30h
3	Maravalha molhada/caixa inclinada 45° (16h)	10:30- 14:30h
4	Confinamento frio (8 °C – 7 min.)	18:00h
5	Prendedor na cauda, com algodão (10 min.)	13:30h
6	Nado forçado (6 min.)	14:00h
7	Confinamento (1.5h)	09:30h
8	Choque (0,7 mA – 3 pulsos de 50ms / 3 min.)	11:00h
9	Banho frio (15°C – 5 min.)	16:30h
10	Maravalha molhada/caixa inclinada 45° (16h)	08:30h
11	Choque (0,7 mA – 3 pulsos de 50ms / 3 min.)	17:30h
12	Confinamento frio (8 °C – 7 min.)	10:00h
13	Prendedor na cauda, com algodão (10 min.)	14:30h
14	Choque (0,7 mA – 3 pulsos de 50ms / 3 min.)	09:00h

2.1.4. Teste de suspensão pela cauda (TSC)

O TSC foi realizado conforme descrito anteriormente (item 1.1.3.).

2.1.5. Teste de borrifagem de sacarose (TBS)

O TBS consiste na borrifagem de uma solução de água contendo 10% de sacarose no dorso do camundongo (Figura 2.2A), seguida da alocação em um funil de vidro (Figura 2.2B), permitindo assim a observação do animal (9 × 7 × 11 cm). A solução, por ser viscosa, faz com que o animal inicie um comportamento de autolimpeza. Após a aplicação da solução de sacarose, a latência para o início da autolimpeza e o tempo total de autolimpeza são contabilizados por um período de 5 minutos e considerados como um indicador de autocuidado e comportamento motivacional, considerados como indicadores de sintomas de depressão, como comportamento apático (WILLNER, 2005; ISINGRINI et al., 2010; MORETTI et al., 2012). O aparato utilizado foi limpo com uma solução de água contendo 10% de álcool entre cada animal testado.

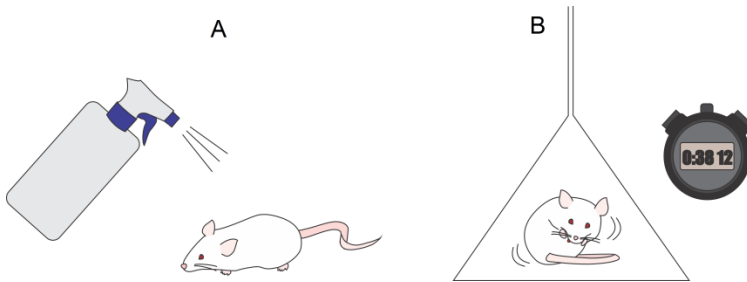


Figura 2. 2. Teste de borrifagem de sacarose (TBS).

No TBS uma solução de água contendo 10% de sacarose é borrifada no dorso do camundongo (A), em seguida o animal é alocado em um funil de vidro que permite a observação do comportamento de autolimpeza (B). Fonte: Do autor.

2.1.6. Teste do campo aberto (TCA)

Para avaliar a atividade locomotora espontânea dos camundongos, os mesmos foram individualmente submetidos ao TCA em uma arena circular (30 cm de diâmetro), com a base marcada em 12 espaços (Figura 2.3). Os camundongos foram colocados no centro do aparato e o número de cruzamentos dos animais nos espaços foi registrado durante um período de 6 minutos. A base do aparato foi limpa com solução de álcool 10% entre os testes. O tempo total na zona central do aparato (4 quadrantes centrais) foi mensurado como parâmetro de ansiedade (KALUEFF, JENSEN e MURPHY, 2007; DIZ-CHAVES et al., 2012; MACHADO et al., 2012a). A base do aparato foi limpa com solução de álcool 10% entre os testes.

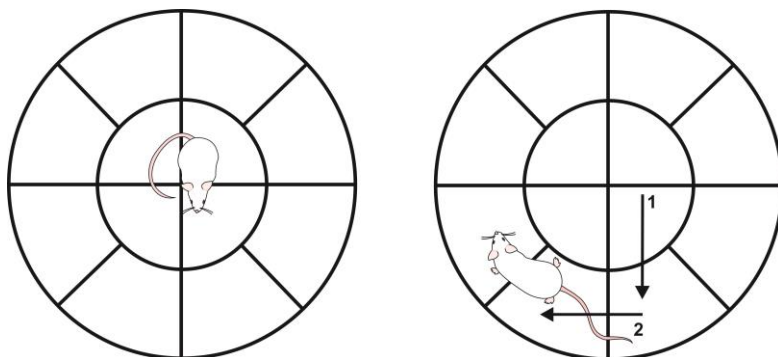


Figura 2. 3. Teste do campo aberto circular.

Neste teste o camundongo é colocado ao centro de uma arena de 30 cm de diâmetro, dividida em 12 espaços. O número total de cruzamentos e o tempo de permanência nos 4 quadrantes centrais foram verificados em um período de 6 minutos. Fonte: Do autor.

2.1.7. Extração de RNA, síntese de cDNA e reação em cadeia da polimerase em tempo real (qRT-PCR)

Os animais foram mortos por decapitação e o hipocampo foi separado e congelado. Posteriormente o RNA total foi extraído pelo método do TRIzol® (Invitrogen, USA), a síntese de cDNA foi realizada utilizando-se 400 ng de RNA total e transcrito reversivelmente com o “High-Capacity cDNA Reverse Transcription” Kit (Applied Biosystems®, USA) e realizado conforme instruções do fabricante. Para realização do qRT-PCR foi utilizado o kit “Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (2X)” (Thermo Scientific™, USA) com pequenas modificações no protocolo do fabricante, ao invés de utilizar 12,5 µL de SYBR green mix e do volume final ser 25 µL, foi usado 5 µL de mix e volume final de 10 µL. As sequências dos genes para Bcl-2 e Bax foram pesquisadas no sítio do National Center for Biotechnology Information (NCBI) na base de dados “Gene” e os respectivos “primers” desenhados de acordo com os exons específicos para cada proteína. As sequências de primers utilizadas foram:

Bcl-2	sense	(5'-GGTGA	
	anti-sense	(5'-CTTCAGAGACAGCCAGGAGAA-3'),	
Bax	sense	(5'-AGAGGATGATTGCCCGCGT-3')	
	anti-sense	(5'-CAACCACCTGGTCTTGGATC-3').	

2.1.8. Níveis de corticosterona no soro

Vinte e quatro horas após o protocolo do ECI os animais foram mortos por decapitação e o sangue foi coletado e em seguida centrifugado a 3000 g por 10 minutos. O soro obtido foi utilizado para a dosagem de corticosterona por meio de um kit de imunoensaio enzimático (Assay Design, Inc. MI, USA) seguindo as instruções do fabricante.

2.1.9. Análise estatística

Os resultados foram analisados por análise de variância (ANOVA) de duas vias seguida de teste post hoc de Newman-Keuls quando apropriado. Foram considerados significativos os valores de $p < 0,05$.

2.2. Resultados

2.2.1. Efeito do tratamento com AU no comportamento tipo-depressivo induzido pela ECI no TSC e ST

A Figura 2.4 mostra que a administração repetida de AU e também de fluoxetina foi capaz de reduzir o tempo de imobilidade dos camundongos no TSC, exercendo assim um efeito tipo-antidepressivo. Ainda, o ECI promoveu um comportamento tipo-depressivo dos camundongos observado pelo aumento no tempo de imobilidade dos animais no TSC. Tanto a administração de AU quanto de fluoxetina foi capaz de prevenir o comportamento tipo-depressivo induzido pelo ECI, causando uma diminuição no tempo de imobilidade dos animais quando comparados ao grupo submetido ao ECI. A ANOVA de duas vias mostrou um efeito significativo do ECI [$F(1,42)=12,78, p<0,01$], do tratamento ($2,42=73,08, p<0,01$) e da interação ECI x tratamento [$F(2,42)=3,40, p<0,05$].

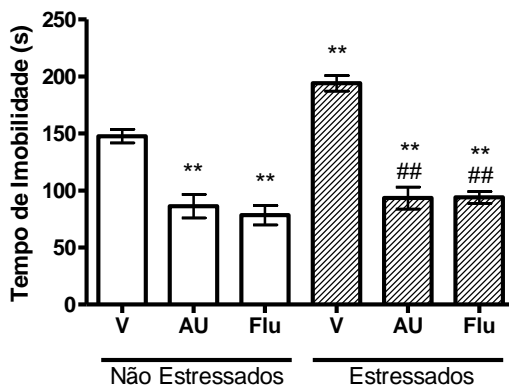


Figura 2. 4. Efeito do AU no comportamento tipo-depressivo induzido pela ECI no TSC.

Efeito do tratamento repetido com AU (0,1 mg/kg) e fluoxetina (10 mg/kg) no comportamento tipo-depressivo induzido pelo ECI no TSC. Os valores estão expressos em média ± E.P.M. (n=8). ** p<0,01 quando comparado ao veículo (V). ## p<0,01 quando comparado ao grupo ECI-V. ANOVA de duas vias seguida de teste post hoc de Newman-Keuls.

A Figura 2.5A mostra que o ECI foi capaz de aumentar a latência para o início do comportamento de autolimpeza no TBS. Esta alteração foi prevenida tanto pelo tratamento com AU quanto com fluoxetina. A Figura 2.5B mostra que tanto o ECI quanto as administrações, não foram capazes de causar alteração no tempo total de autolimpeza no TBS. A ANOVA de duas vias mostrou um efeito significativo do ECI [$F(1,42)=5,11$, $p<0,05$], mas não do tratamento [$F(2,42)=2,44$, $p=0,10$] ou da interação ECI x tratamento [$F(2,42)=2,98$, $p=0,06$] para o tempo de latência e um efeito significativo da interação ECI x tratamento [$F(2,42)=4,73$, $p<0,05$], mas não do ECI [$F(1,42)=1,77$, $p=0,19$] ou do tratamento [$F(2,42)=0,59$, $p=0,56$] para o tempo de autolimpeza.

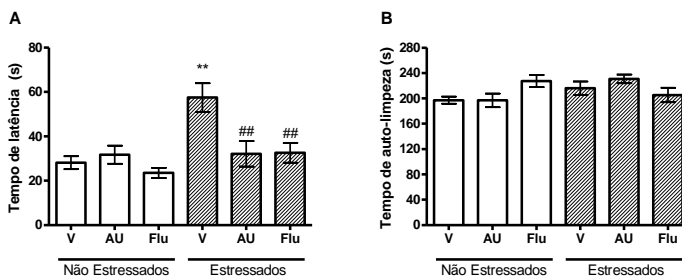


Figura 2. 5. Efeito do AU no comportamento tipo-depressivo induzido pela ECI noTBS.

Efeito do tratamento repetido com AU (0,1 mg/kg) e fluoxetina (10 mg/kg) em prevenir o aumento no tempo de latência para a autolimpeza induzido pelo ECI (A) e no tempo total de autolimpeza no TBS (B). Os valores estão expressos em média \pm E.P.M. (n=8). ** $p<0,01$ quando comparado ao veículo (V). ## $p<0,01$ quando comparado ao grupo ECI-V. ANOVA de duas vias seguida de teste post hoc de Newman-Keuls.

2.2.2. Efeito do tratamento com AU e do protocolo de ECI na locomoção e no tempo no centro no TCA

Os resultados apresentados na Figura 2.6A e 2.6B mostram que tanto o ECI quanto as administrações não causaram alterações na atividade locomotora e no tempo de permanência dos animais ao centro do aparato no TCA. A ANOVA de duas vias não mostrou um efeito significativo do ECI [$F(1,42)=4,02$, $p=0,06$], do tratamento [$F(2,42)=0,57$, $p=0,57$] ou da interação tratamento x ECI [$F(2,42)=0,97$, $p=0,39$] para o número de cruzamentos e nenhum efeito significativo do ECI [$F(1,42)=0,54$, $p=0,47$], do tratamento [$F(2,42)=1,15$, $p=0,33$] ou da interação ECI x tratamento [$F(2,42)=0,13$, $p=0,88$] para o tempo no centro do aparato no TCA.

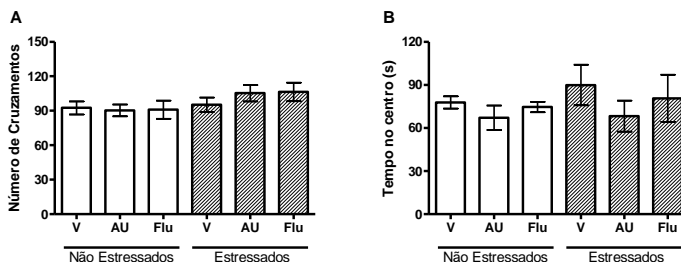


Figura 2. 6. Efeito do tratamento com AU na locomoção e no comportamento tipo-ansioso induzido pelo ECI no TCA.

Efeito do tratamento repetido com AU (0,1 mg/kg) e fluoxetina (10 mg/kg) no número de cruzamentos (A) e tempo total de permanência no centro (B) no TCA. Os valores estão expressos em média \pm E.P.M. ($n=8$).

2.2.3. Efeito do tratamento com AU na expressão gênica (RNAm) de Bcl-2 e Bax

Os resultados apresentados na Figura 2.7A mostram que não ocorreram alterações significativas para a expressão gênica (RNAm) de Bcl-2. Em relação a expressão gênica de Bax, o protocolo do ECI causou aumento no RNAm em relação ao controle, o qual foi prevenido pela administração repetida de AU (Figura 2.7B). Quando analisada a razão relativa da expressão da proteína anti-apoptótica (Bcl-2) em relação à proteína pró-apoptótica (Bax), o protocolo ECI reduziu significativamente a razão Bcl-2/Bax em relação ao controle. Os tratamentos com AU e fluoxetina causaram um aumento tanto em

relação ao grupo ECI quanto ao grupo controle (Figura 2.7C). A ANOVA de duas vias não mostrou um efeito significativo do ECI [F (1,12)=0,89, $p=0,36$], do tratamento [F (2,12)=1,11, $p=0,36$] ou da interação ECI x tratamento [F (2,12)=0,60, $p=0,56$] para Bcl-2, efeito significativo do ECI [F (1,12)=5,05, $p<0,05$], do tratamento [F (2,12)=4,82, $p<0,05$] e da interação ECI x tratamento [F (2,12)=4,14, $p=0,56$] para Bax e efeito significativo do ECI [F (1,12)=37,87, $p<0,01$], do tratamento [F (2,12)=60,56, $p<0,01$] e da interação ECI x tratamento [F (2,12)=70,55, $p<0,01$] para a razão Bcl2/Bax.

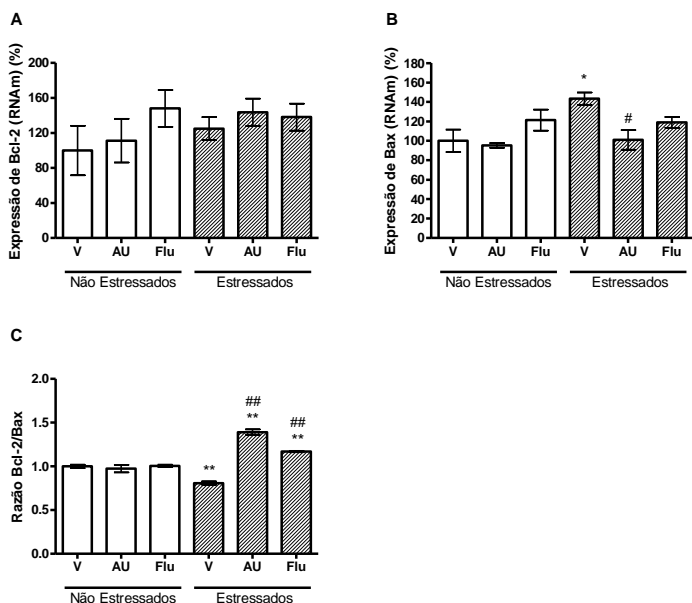


Figura 2. 7. Expressão gênica (RNAm) de Bcl-2 e Bax.

Efeito do tratamento repetido com AU e fluoxetina (Flu) sobre a expressão gênica (RNAm) de Bcl-2 (A) e Bax (B) e sobre a razão relativa Bcl-2/Bax (C) no protocolo do ECI. O grupo controle foi considerado como 100% de expressão (A e B) e considerado como valor 1,0 para a razão relativa. Os valores estão expressos em média \pm E.P.M. (n=3). * $p<0,05$ e ** $p<0,01$ quando comparado ao veículo (V). ## $p<0,05$ e ### $p<0,01$ quando comparado ao grupo ECI-V. ANOVA de duas vias seguida de teste post hoc de Newman-Keuls.

2.2.4. Dosagem de corticosterona

Como mostrado na Figura 2.8, tanto o ECI quanto os tratamentos não causaram alterações nos níveis de corticosterona no soro. A ANOVA de duas vias não revelou diferenças significativas do ECI [$F(1,30)=0,06$, $p=0,82$], do tratamento [$F(2,30)=2,70$, $p=0,08$] ou da interação ECI x tratamento [$F(2,30)=0,18$, $p=0,83$].

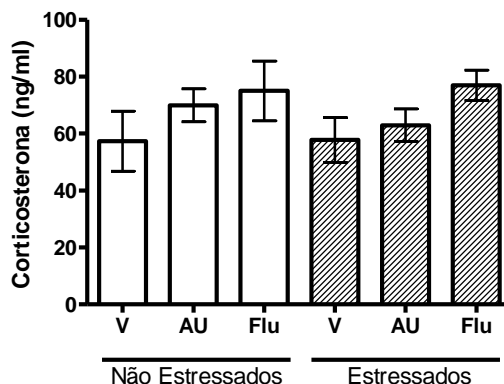


Figura 2. 8. Níveis de corticosterona sérica.

Figura 2.8. Efeito do tratamento repetido com AU e fluoxetina nos níveis séricos de corticosterona dos camundongos submetidos ao ECI. Os valores estão expressos em média \pm E.P.M. ($n=6$). A ANOVA de duas vias não demonstrou diferenças significativas.

2.3. Discussão

O estresse crônico exerce forte influência no desenvolvimento da depressão e ansiedade tanto em humanos como em roedores. O protocolo de ECI foi desenvolvido a fim de mimetizar fatores ambientais que contribuem para o desencadeamento do transtorno depressivo em humanos, sendo considerado como um modelo de validade de face (produz sintomas relacionados com a depressão), de constructo (reproduz características fisiopatológicas semelhantes à condição humana) e preditiva (as alterações comportamentais podem ser revertidas pelo tratamento repetido com antidepressivos) (LU et al., 2006; BONDI et al., 2008; LARSEN et al., 2010; KUMAR, KUHAD e CHOPRA, 2011). Neste trabalho, após o ECI os animais foram testados no TSC e no TBS a fim de verificar o comportamento tipo-depressivo e

no TCA para verificar a atividade locomotora (cruzamentos) e comportamento tipo-ansioso (tempo no centro do aparato). Os resultados deste trabalho demonstram primeiramente que a administração repetida de AU (0,1 mg/kg durante 7 dias), assim como do antidepressivo fluoxetina (10 mg/kg, durante 7 dias), produziram um efeito tipo-antidepressivo no TSC. Além disso, o protocolo do ECI produziu um comportamento tipo-depressivo, o qual foi verificado pelo aumento no tempo de imobilidade dos animais no TSC e também na latência para o início do comportamento de autolimpeza no TBS, alterações estas que foram prevenidas pela administração tanto com o AU quanto com a fluoxetina. Além destas alterações relacionadas a um comportamento tipo-depressivo, o ECI é um protocolo capaz de causar alterações tipo-ansiosas em animais (BISAZ e SANDI, 2010; DING et al., 2014), as quais podem ser verificadas no TCA pela diminuição do tempo de permanência no centro do aparato (WU et al., 2012a; WU et al., 2012b). No nosso trabalho, o ECI não foi efetivo em causar uma alteração tipo-ansiosa no TCA.

O protocolo do ECI é capaz de produzir um comportamento tipo-depressivo no TSC observado pelo aumento no tempo de imobilidade dos animais submetidos ao teste (MORETTI et al., 2012). Neste trabalho este comportamento também foi observado, sendo que a administração repetida tanto de AU quanto de fluoxetina foi capaz de impedir essa alteração, demonstrando assim um efeito tipo-antidepressivo de ambos os compostos. De fato, o efeito tipo-antidepressivo do AU já havia sido demonstrado tanto no TSC quanto no TNF (MACHADO et al., 2012c), porém de maneira aguda e sem a indução de comportamento tipo-depressivo por meio de algum protocolo experimental. Desta forma, este trabalho se destaca por mostrar pela primeira vez o efeito tipo-antidepressivo do tratamento repetido com AU em um modelo de comportamento tipo-depressivo (ECI).

Além do comportamento tipo-depressivo avaliado no TSC, este trabalho também utilizou outro teste comportamental, o TBS, no qual um aumento na latência para que o animal inicie o comportamento de autolimpeza, bem como uma redução no tempo total deste comportamento são considerados como parâmetros motivacionais e de autocuidado correlacionados com sintomas de depressão como comportamento apático (WILLNER, 2005; ISINGRINI et al., 2010). De fato, a literatura demonstra que diferentes protocolos de indução de comportamento tipo-depressivo, como ECI, bulbectomia olfatória e isolamento social, podem causar um aumento na latência para o início

do comportamento de autolimpeza e diminuição no tempo total de autolimpeza dos animais no TBS e que o tratamento repetido com agentes antidepressivos é capaz de prevenir estas alterações (MACHADO et al., 2012a; MORETTI et al., 2012; FREITAS et al., 2013a; FREITAS et al., 2013b; TAKATSU-COLEMAN et al., 2013). Neste trabalho, o ECI foi capaz de aumentar o tempo de latência para iniciar o comportamento de autolimpeza no TBS, porém não causou alterações no tempo total de autolimpeza. Cabe destacar, que o aumento no tempo de latência induzido pelo ECI foi prevenido tanto pela administração de AU quanto de fluoxetina, reforçando o efeito tipo-antidepressivo do AU. A literatura mostra que em roedores as fêmeas são geralmente mais responsivas a agentes estressores do que os machos em relação ao comportamento tipo-depressivo (FARADAY, 2002) e uma vez que neste protocolo utilizamos camundongos machos isso poderia explicar a inefetividade do ECI em causar uma diminuição no tempo total de autolimpeza dos animais quando submetidos ao TBS, diferentemente de outros trabalhos que utilizam fêmeas submetidas ao ECI ou outros protocolos de indução de comportamento tipo-depressivo (MACHADO et al., 2012a; MORETTI et al., 2012; FREITAS et al., 2013a; FREITAS et al., 2013b).

O TCA é um teste comportamental amplamente utilizado para a avaliação da atividade locomotora espontânea e também do comportamento tipo-ansioso de roedores (RODRIGUES et al., 1996; CHOLERIS et al., 2001; PRUT e BELZUNG, 2003). Para descartar que os resultados encontrados no TSC e TBS pudessem ter sido obtidos devido a alguma alteração na atividade locomotora dos camundongos, os mesmos foram submetidos ao TCA (RODRIGUES et al., 2002). Neste trabalho nenhum tratamento ou protocolo causou alterações na atividade locomotora dos animais, descartando um eventual efeito locomotor ou psicoestimulante de ambos. Além do parâmetro locomotor, o TCA também pode ser utilizado para verificar comportamento tipo-ansioso, sendo que protocolos que podem causar comportamento tipo-ansioso como o ECI, promovem uma diminuição do tempo total de permanência do animal no centro do aparato (WU et al., 2012a; WU et al., 2012b). Os resultados deste trabalho demonstram que o ECI não foi efetivo em causar uma diminuição do tempo de permanência no centro no TCA. Estes dados demonstram que, possivelmente, a quantidade de estressores por dia e o período de tempo utilizados no protocolo foram insuficientes para causar essas alterações impedindo assim a verificação de um possível efeito tipo-ansiolítico do AU. De fato, diferentes trabalhos demonstram que a utilização de um

período superior de protocolo de estresse (28-30 dias), bem como a utilização de mais de 1 estressor por dia, são efetivos em promover alterações tipo-ansiosas avaliadas em diferentes testes comportamentais, incluindo no TCA, em camundongos (BISAZ e SANDI, 2010; WU et al., 2012a; WU et al., 2012b; DING et al., 2014).

O processo apoptótico é controlado pelo equilíbrio entre proteínas anti- e pró-apoptóticas dentro da célula. A proteína anti-apoptótica Bcl-2 pode interagir com a proteína pro-apoptótica Bax através de homo e heterodimerização na membrana mitocondrial externa (LINDSTEN, ZONG e THOMPSON, 2005). Quando os níveis de Bcl-2 encontram-se reduzidos o limiar para a apoptose também se encontra reduzido (MCKERNAN, DINAN e CRYAN, 2009) uma vez que Bax pode comprometer a integridade da membrana mitocondrial, contribuindo com a liberação de fatores apoptogênicos, como citocromo c, para o citosol, com a ativação de caspase e com a morte celular (MCKERNAN, DINAN e CRYAN, 2009). Os resultados deste estudo demonstram um aumento significativo no RNAm de Bax no hipocampo de camundongos submetidos ao ECI, bem como a capacidade de prevenção deste aumento pela administração tanto de AU quanto de fluoxetina. Um aumento no RNAm de Bax sugere um possível aumento na apoptose neuronal dos animais submetidos ao ECI. Apesar do RNAm de Bcl-2 não ter sido alterado, a razão Bcl-2/Bax mostrou-se significativamente reduzida no grupo ECI e aumentada tanto em relação ao grupo ECI quanto ao grupo controle nos animais tratados com AU e fluoxetina e submetidos ao ECI. Essa diminuição da razão anti- vs pró-apoptótica está associada com uma maior vulnerabilidade à ativação apoptótica e a morte celular (LINDSTEN, ZONG e THOMPSON, 2005). De fato, pacientes depressivos podem apresentar redução do volume hipocampal possivelmente decorrentes da morte neuronal (CAMPBELL et al., 2004; PITTENGER e DUMAN, 2008). De acordo com os resultados encontrados neste trabalho, diferentes estudos demonstram alterações na expressão gênica para proteínas pró e anti-apoptóticas, incluindo aumento na expressão gênica hipocampal de Bax bem como diminuição na razão Bcl-2/Bax em modelos de depressão induzidos por estresse e pelo ECI e mostram também a capacidade de diferentes agentes antidepressivos em prevenir as alterações causadas pelos modelos nesse parâmetro (KOSTEN et al., 2008; WANG, Y. et al., 2011; DING et al., 2014; YU et al., 2014). Porém, cabe destacar que as alterações na quantidade de RNAm das proteínas pró e anti apoptóticas pode não se traduzir em alterações semelhantes nos seus níveis.

Neste trabalho não foi encontrada nenhuma alteração significativa nos níveis de corticosterona nos diferentes grupos experimentais. Resultados semelhantes foram encontrados em outros trabalhos relatados na literatura, os quais também utilizaram o ECI como protocolo de indução de comportamento tipo-depressivo (NOSCHANG et al., 2009; MORETTI et al., 2012). Além disso, estudos que demonstram alterações nos níveis de corticosterona após protocolos de estresse utilizaram protocolos mais prolongados (28, 40 e 48 dias), os quais foram capazes de promover um aumento nos níveis de corticosterona em roedores (CHEN et al., 2007; GARCIA et al., 2009; JINDAL, MAHESH e BHATT, 2013). De fato, a secreção de corticosterona parece estar relacionada a diferenças na natureza e no período de tempo do protocolo de estresse, bem como na espécie e linhagem utilizada no trabalho (PITMAN, OTTENWELLER e NATELSON, 1990), o que poderia explicar, ao menos em parte, os resultados diferentes encontrados quanto aos níveis de corticosterona após a aplicação do ECI.

O protocolo do ECI é capaz de causar alterações tipo-depressivas em roedores (CHOLERIS et al., 2001; HAMMACK et al., 2009; JINDAL, MAHESH e BHATT, 2013). Os resultados deste trabalho demonstram um efeito tipo-antidepressivo do AU, o qual foi capaz de prevenir o comportamento tipo-depressivo induzido pelo ECI em parâmetros analisados em dois diferentes testes comportamentais, TSC e TBS. Também impediu o aumento do RNAm da proteína pró-apoptótica Bax e a diminuição da razão Bcl-2/Bax no hipocampo dos animais submetidos ao protocolo. Estes dados, em conjunto com dados prévios que demonstram o efeito tipo-antidepressivo do AU (MACHADO et al., 2012c), bem como seu efeito neuroprotetor (HONG, JEONG e JUN, 2012; LI et al., 2013), reforçam a importância de aprofundar os estudos relacionados aos efeitos antidepressivos do AU em modelos relacionados ao estresse.

CAPÍTULO 3. EFEITOS DO ÁCIDO URSÓLICO EM UM MODELO DE COMPORTAMENTO TIPO-DEPRESSIVO INDUZIDO PELA ADMINISTRAÇÃO REPETIDA DE CORTICOSTERONA.

O eixo HPA possui um papel chave na resposta ao estresse, sendo que muitos estudos revelam que a desregulação deste eixo é uma condição que colabora diretamente para o desenvolvimento da depressão (HOLSBOER, 1999; PAPIOL et al., 2007; HOLSBOER e ISING, 2008). Neste contexto, o cortisol (em roedores corticosterona), componente crítico na resposta ao estresse, parece ser responsável por contribuir com muitas das alterações comportamentais e neurobiológicas decorrentes do estresse (OLAUSSON et al., 2013).

Além da desregulação do eixo HPA, o BDNF tem sido sugerido como diretamente envolvido na fisiopatologia da depressão (LINDHOLM e CASTREN, 2014). Níveis de BDNF encontram-se reduzidos em tecidos postmortem de pacientes depressivos bem como em estruturas encefálicas, como o córtex pré-frontal de roedores submetidos a modelos animais de depressão (BANERJEE et al., 2013; JINDAL, MAHESH e BHATT, 2013). Esta redução pode ser revertida pelo tratamento repetido com antidepressivos (LI et al., 2007; MAO et al., 2012). De fato, as alterações nos níveis de BDNF estão diretamente relacionadas aos benefícios terapêuticos dos antidepressivos, fazendo com que o BDNF deva ser considerado como um importante alvo do tratamento antidepressivo (SCHMIDT e DUMAN, 2010).

Estudos pré-clínicos em roedores demonstram que a exposição repetida à corticosterona exógena induz alterações comportamentais, neuroquímicas e morfológicas tipo-depressivas e tipo-ansiosas (DAVID et al., 2009; MAO et al., 2012; WANG et al., 2013; ROSA et al., 2014). Ainda, sintomas do transtorno depressivo, como anedonia, ocorrem frequentemente em conjunto com transtornos de ansiedade (NESTLER et al., 2002). Considerando isto, este estudo objetivou investigar o efeito do tratamento com AU em um modelo de comportamento tipo-depressivo induzido pelo protocolo CORT no TSC, no teste TCS, bem como o comportamento tipo-ansioso no TCA e analisar os níveis séricos de corticosterona e de BDNF no córtex pré-frontal dos camundongos submetidos ao protocolo.

3.1 Material e métodos

3.1.1 Animais

Camundongos Swiss fêmeas (35-40 g, de aproximadamente 60 dias de idade) mantidos sob condições padrão de biotério 20-22°C), com livre acesso a água e comida, em ciclo claro/escuro de 12:12 horas (luz acessa as 07:00 horas) e aclimatizados na sala de experimentação 24 horas antes dos testes comportamentais foram utilizados. Os experimentos, aprovados pela CEUA da UFSC (protocolo n° PP00795), foram realizados durante o ciclo claro, sendo gravados (exceto para o TCS) e avaliados por experimentador que desconhecia os grupos experimentais, utilizando grupos independentes de animais (n=8 para os testes comportamentais e n=6 para dosagem de corticosterona sérica e verificação dos níveis de BDNF no córtex pré-frontal). Neste estudo foram utilizados camundongos fêmeas tendo em vista a maior ocorrência de depressão em mulheres em relação a homens (SOARES e ZITEK, 2008; BULLOCH et al., 2013), além do fato de roedores fêmeas serem mais responsivos, em relação a machos, quanto ao comportamento tipo-depressivo relacionado à aplicação de agentes estressores (FARADAY, 2002).

3.1.2. Ferramentas farmacológicas e tratamentos

Para a realização deste estudo foram utilizados AU, fluoxetina e corticosterona (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA). A corticosterona foi dissolvida em água destilada contendo 10% de Tween 80 e 1% de dimetil sulfóxido (DMSO). O AU foi diluído em água destilada com 10% de Tween 80 e a fluoxetina (controle positivo) em água destilada. Todos os compostos foram administrados oralmente. O protocolo CORT consistiu na administração repetida, durante 21 dias de corticosterona (20 mg/kg p.o.). O AU (0,1 mg/kg, p.o.) e a fluoxetina (10 mg/kg, p.o.) foram administrados durante os últimos 7 dias do protocolo CORT. Todos os compostos foram administrados em um volume constante de 10 ml/kg de peso corporal e os grupos controles receberam veículo apropriado. Para este estudo os animais foram divididos em 6 grupos experimentais: (1) veículo + veículo; (2) veículo + AU; (3) veículo + fluoxetina; (4) CORT + veículo; (5) CORT + AU; (6) CORT + fluoxetina.

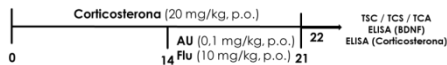


Figura 3. 1. Protocolo experimental.

O protocolo CORT constituiu-se na administração de corticosterona por 21 dias. Do décimo quarto ao vigésimo primeiro dia os animais foram tratados com AU ou fluoxetina. No vigésimo segundo dia de protocolo os animais foram submetidos aos testes comportamentais bem como tiveram o córtex pré-frontal e soro coletados para análises posteriores.

3.1.3. Teste de suspensão pela cauda (TSC)

O TSC foi realizado conforme descrito anteriormente (item 1.1.3.).

3.1.4. Teste de consumo de sacarose (TCS)

No TCS os camundongos foram condicionados pelo período de 24 horas, em caixas individuais contendo duas garrafas, uma com água e outra com solução contendo 2% de sacarose (TAKATSU-COLEMAN et al., 2013). Para prevenir um possível efeito de preferência por alguns dos lados da caixa, as garrafas foram invertidas após um período de 12 horas. O consumo de sacarose foi calculado como a porcentagem de consumo da solução de sacarose em relação ao total de líquido consumido (água + sacarose). A diminuição do consumo de sacarose, uma solução altamente palatável para os animais, é considerada como um indicador de comportamento anedônico (WEISS, 1997).

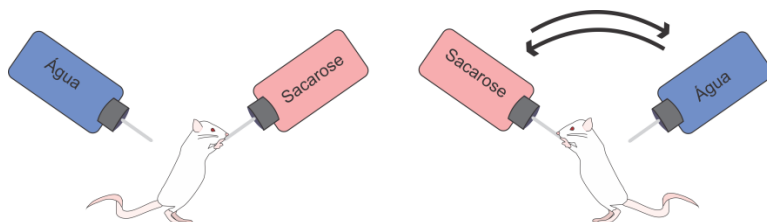


Figura 3. 2. Teste de consumo de sacarose (TCS).

No teste de consumo de sacarose os animais são alocados individualmente em caixas contendo uma garrafa com água e outra com solução de sacarose (2%). O consumo de sacarose em relação ao total de líquido consumido (água + sacarose) foi avaliado após 24 horas. As garrafas foram invertidas de posição para evitar a preferência por um dos lados da caixa. Fonte: Do autor.

3.1.5 Teste do campo aberto (TCA)

O TCA, assim como os parâmetros analisados, foi realizado conforme item 2.1.6.

3.1.6. Níveis de corticosterona no soro

Vinte e quatro horas após o protocolo CORT (período da manhã) os animais foram mortos por decapitação e o sangue foi coletado e em seguida centrifugado a 3000 g por 10 minutos. O soro obtido foi utilizado para a dosagem de corticosterona por meio de um kit de imunoenensaio enzimático (Assay Design, Inc. MI, USA) seguindo as instruções do fabricante.

3.1.7. Níveis de BDNF no córtex pré-frontal

Vinte e quatro horas após o protocolo CORT os camundongos foram mortos por decapitação e o córtex pré-frontal foi removido e acondicionado em freezer -80°C para posterior verificação dos níveis de BDNF. Os níveis de BDNF foram mensurados por um KIT ELISA para BDNF (Promega, BDNF Emax® ImmunoAssay System) segundo protocolo do fabricante. Os dados foram expressos em ng por gramas (g) de proteína. A dosagem de proteínas foi realizada pelo método de Peterson (PETERSON, 1983). A leitura foi realizada em 620 nm e as concentrações foram obtidas através de uma curva-padrão utilizando albumina de soro bovino.

3.1.8. Análise estatística

Os resultados foram analisados por análise de variância (ANOVA) de duas vias seguida de teste post hoc de Newman-Keuls quando apropriado. Foram considerados significativos os valores de $p < 0,05$.

3.2. Resultados

3.2.1. Efeito do tratamento com AU no comportamento tipo-depressivo induzido por CORT no TSC e TCS

A Figura 3.2A mostra que a administração repetida, tanto de AU quanto de fluoxetina exerceu efeito tipo-antidepressivo verificado pela redução no tempo de imobilidade dos animais no TSC em relação ao controle. Além disso, o CORT causou a indução de um comportamento tipo-depressivo verificado pelo aumento no tempo de imobilidade no TSC. Este comportamento foi prevenido pela administração de AU e fluoxetina. A ANOVA de duas vias mostrou efeito significativo do tratamento [$F(2,42)=40,28, p<0,01$], da interação CORT x tratamento [$F(2,42)=3,69, p<0,05$], mas não do protocolo CORT [$F(1,42)=1,08, p=0,30$].

A Figura 3.2B mostra que o protocolo CORT promoveu um comportamento tipo-anedônico caracterizado pela diminuição no consumo de sacarose em relação ao grupo controle. O tratamento repetido tanto com AU quanto com fluoxetina foi capaz de prevenir essa diminuição no consumo, demonstrando um efeito tipo-antidepressivo no TCS. A ANOVA de duas vias revelou efeito significativo do protocolo CORT [$F(1,42)=12,07, p<0,01$], do tratamento [$F(2,42)=10,95, p<0,01$] e da interação CORT x tratamento [$F(2,42)=12,30, p<0,01$].

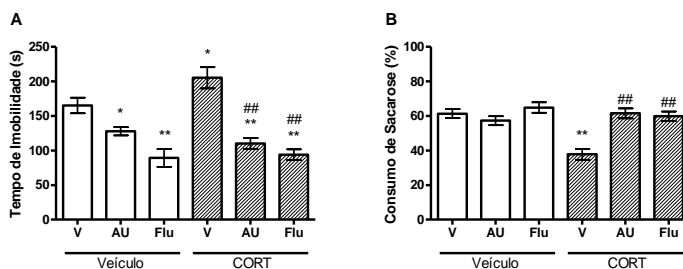


Figura 3. 3. Efeito do AU no comportamento tipo-depressivo induzido por CORT no TSC e TCS.

Efeito do tratamento repetido com AU (0,1 mg/kg) e fluoxetina (10 mg/kg) no comportamento tipo-depressivo induzido por CORT no TSC (A) e TCS (B). Os valores estão expressos em média \pm E.P.M. (n=8). * $p<0,05$ e ** $p<0,01$ quando comparado ao veículo (V). ## $p<0,01$ quando comparado ao grupo CORT-V. ANOVA de duas vias seguida de

teste post hoc de Newman-Keuls.

3.2.2. Efeito do tratamento com AU na atividade locomotora e nos parâmetros de ansiedade avaliados no TCA.

Os resultados apresentados na Figura 3.3A mostra que nem o CORT nem as administrações causaram alteração na atividade locomotora dos camundongos. No que diz respeito aos parâmetros de ansiedade avaliados no teste, o CORT promoveu uma diminuição no tempo total de permanência dos camundongos no centro do campo aberto e os tratamentos com AU e fluoxetina foram capazes de prevenir esta alteração comportamental (Figura 3.3B). A ANOVA de duas vias não mostrou efeito significativo protocolo CORT [F (1,42)=2,13, p=0,15], do tratamento [F (2,42)=1,16, p=0,32] ou da interação CORT x tratamento [F (2,42)=0,88, p=0,42] para o número de cruzamentos e mostrou efeito significativo do protocolo CORT [F (1,42)=13,69, p<0,01], do tratamento [F (2,42)=9,94, p<0,01] e da interação CORT x tratamento [F (2,42)=3,21, p<0,05] para o tempo de permanência no centro do campo aberto no TCA.

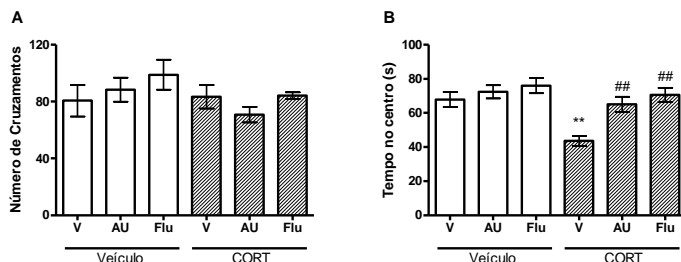


Figura 3. 4. Efeito do tratamento com AU na atividade locomotora e nos parâmetros de ansiedade avaliados no TCA.

Efeito do tratamento repetido com AU (0,1 mg/kg) e fluoxetina (10 mg/kg) no número de cruzamentos (A) e no tempo total de permanência no centro (B) no TCA. Os valores estão expressos em média \pm E.P.M. (n=8). ** p<0,01 quando comparado ao veículo (V). ## p<0,01 quando comparado ao grupo CORT-V ANOVA de duas vias seguida de teste post hoc de Newman-Keuls.

3.2.3. Efeito do tratamento com AU sobre os níveis séricos de corticosterona de camundongos submetidos ou não a CORT

Como apresentado na Figura 3.4, o protocolo CORT causou uma redução significativa nos níveis de corticosterona no plasma demonstrando a efetividade do protocolo em induzir alterações no eixo HPA. Essa redução foi parcialmente revertida pelo tratamento com fluoxetina, mas não com AU. A ANOVA de duas vias mostrou efeito significativo do protocolo CORT [$F(1,30)=219,50$, $p<0,01$], do tratamento [$F(2,30)=5,11$, $p<0,05$] e da interação CORT x tratamento [$F(2,30)=5,32$, $p=0,05$].

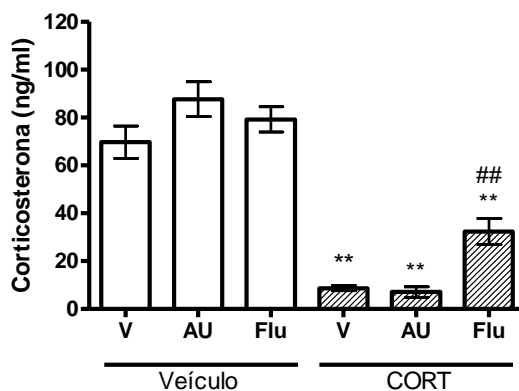


Figura 3. 5. Níveis de corticosterona sérica.

Efeito do protocolo CORT em reduzir os níveis séricos de corticosterona em camundongos. Os valores estão expressos em média ± E.P.M. (n=6). ** $p<0,01$ quando comparado ao veículo (V). ## $p<0,01$ quando comparado ao grupo CORT-V. ANOVA de duas vias seguida de teste post hoc de Newman-Keuls.

3.2.4. Níveis de BDNF no córtex pré-frontal de camundongos submetidos ou não a CORT e tratados com AU

A Figura 3.5 mostra os níveis de BDNF no córtex pré-frontal dos camundongos. O tratamento repetido com fluoxetina per se foi capaz de aumentar os níveis de BDNF no córtex pré-frontal, diferentemente do grupo AU, o qual não apresentou alterações. Ainda, o protocolo CORT causou uma diminuição nos níveis de BDNF no córtex pré-frontal, a qual foi impedida pela administração tanto de AU quanto de fluoxetina. A ANOVA de duas vias mostrou efeito significativo do tratamento [$F(2,30)=17,34, p<0,01$] e da interação CORT x tratamento [$F(2,30)=4,75, p<0,05$], mas não do protocolo CORT [$F(1,30)=2,57, p=0,12$].

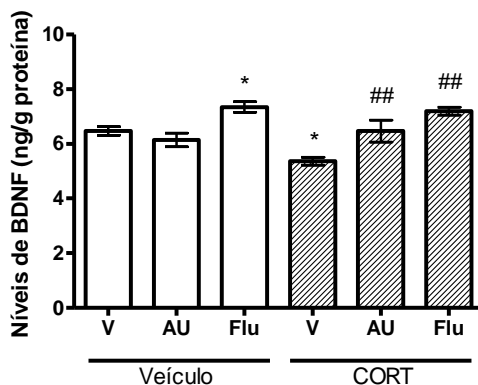


Figura 3. 6. Níveis de BDNF no córtex pré-frontal.

Efeito do AU e fluoxetina em proteger da redução dos níveis de BDNF no córtex pré-frontal de camundongos induzida pelo protocolo CORT. Os valores estão expressos em média \pm E.P.M. ($n=6$). * $p<0,05$ quando comparado ao veículo (V). ## $p<0,01$ quando comparado ao grupo CORT-V. ANOVA de duas vias seguida de teste post hoc de Newman-Keuls.

3.3. Discussão

O protocolo de CORT é capaz de produzir em roedores alterações comportamentais e neurobiológicas paralelas a sintomas associados com a depressão humana, desta forma se constitui em uma ferramenta bastante utilizada no desencadeamento de comportamento tipo-depressivo e tipo-ansioso possuindo validade de face (causa sintomas relacionados à doença), de constructo (reproduz características fisiopatológicas semelhantes à condição humana) e validade preditiva (o tratamento repetido com antidepressivos pode reverter as alterações do modelo) (AGO et al., 2008; MURRAY, SMITH e HUTSON, 2008; DAVID et al., 2009; GOURLEY e TAYLOR, 2009; STERNER e KALYNCHUK, 2010; KOIKE, IJIMA e CHAKI, 2013; OLAUSSON et al., 2013). Neste trabalho, após o protocolo CORT os camundongos foram testados no TSC e no TCS para verificar o comportamento tipo-depressivo e no TCA para atividade locomotora (cruzamentos) e comportamento tipo-ansioso (tempo de permanência no centro). Os resultados demonstram que a administração repetida de AU (0,1 mg/kg, 7 dias), assim como de fluoxetina, produziu um efeito tipo-antidepressivo no TSC. Além disso, o protocolo do CORT foi capaz de produzir um comportamento tipo-depressivo nos camundongos, verificado pelo aumento no tempo de imobilidade no TSC e a diminuição do consumo de sacarose no TCS. Tanto a administração repetida de AU quanto de fluoxetina foi capaz de prevenir este comportamento tipo-depressivo observado em ambos os testes. Em relação ao comportamento tipo-ansioso, o protocolo CORT causou uma diminuição do tempo de permanência dos animais no centro do campo aberto, sendo esta alteração também prevenida pelo tratamento com AU e fluoxetina, demonstrando um possível efeito tipo-ansiolítico do AU.

O TSC é um dos mais utilizados testes comportamentais para a investigação dos mecanismos patológicos da depressão. Neste teste, compostos com efeito tipo-antidepressivo promovem um comportamento de escape do animal, diminuindo o tempo de imobilidade dos animais submetidos ao teste (STERU et al., 1985; CRYAN, MOMBÉREAU e VASSOUT, 2005; CUNHA et al., 2008). Por outro lado, diversas condições estressantes e agentes pró-depressivos são capazes de aumentar o tempo de imobilidade neste teste, indicativo de um efeito tipo-depressivo (MORETTI et al., 2012; ROSA et al., 2014). Quando submetidos ao protocolo CORT, os animais apresentam um comportamento tipo-depressivo (aumento no tempo de imobilidade) no TSC, desta forma o TSC pode ser considerado um teste comportamental responsivo ao protocolo (DAVID et al., 2009). Neste

trabalho, as administrações repetidas de AU e de fluoxetina foram capazes de reduzir o tempo de imobilidade dos animais não submetidos ao protocolo CORT em relação ao grupo controle, demonstrando efeito tipo-antidepressivo. Tanto o tratamento repetido com AU quanto com fluoxetina foi capaz de prevenir o comportamento tipo-depressivo induzido pelo CORT. De acordo, estudos prévios demonstraram que a administração aguda de AU possui efeito tipo-antidepressivo no TSC e TNF (MACHADO et al., 2012c) e também que a administração repetida de AU na mesma dose e tempo das utilizadas neste capítulo (0,1 mg/kg, 7 dias) também apresentou efeito tipo-antidepressivo quando comparadas ao grupo controle e foi capaz de prevenir um modelo de indução de comportamento tipo-depressivo, o modelo do ECI (Ver capítulo 2).

O TCS é um indicador de comportamento tipo-anedônico em roedores. A anedonia é um dos sintomas chave da depressão, representando uma condição na qual a capacidade de sentir prazer em alguma atividade é parcialmente ou até totalmente perdida (DER-AVAKIAN e MARKOU, 2012; DI GIANNANTONIO e MARTINOTTI, 2012; KUHLMANN, WALTER e SCHLAPFER, 2013). Em roedores a anedonia é avaliada pela indução da diminuição da responsividade a recompensas, como, por exemplo, uma diminuição do consumo de sacarose (alimento doce) ou redução da preferência por soluções adocicadas (WILLNER, MUSCAT e PAPP, 1992; STERNER e KALYNCHUK, 2010). O protocolo de CORT é um modelo capaz de induzir um comportamento tipo-anedônico em roedores, o qual pode ser revertido pela administração de compostos antidepressivos (WILLNER, MUSCAT e PAPP, 1992; GOURLEY e TAYLOR, 2009; STERNER e KALYNCHUK, 2010). Nossos resultados demonstram que CORT causou uma diminuição no consumo de sacarose no TCS e que os tratamentos repetidos com AU e também com fluoxetina foram capazes de prevenir este comportamento tipo-anedônico, reforçando o efeito tipo-antidepressivo do AU.

Uma efetiva ferramenta para analisar a atividade locomotora espontânea e comportamento tipo-ansioso de animais é o TCA (RODRIGUES et al., 1996; CHOLERIS et al., 2001). Para descartar a possibilidade que os resultados obtidos no TSC e no TCS fossem atribuídos a alterações na atividade locomotora dos animais, os mesmos foram submetidos ao TCA. Nenhum tratamento ou protocolo afetou significativamente a locomoção espontânea dos animais, descartando a influência locomotora nos resultados. Além da locomoção espontânea, o TCA é utilizado também para a análise do comportamento tipo-ansioso

de animais (KALUEFF, JENSEN e MURPHY, 2007; MACHADO et al., 2012a). Os resultados encontrados neste trabalho mostram que o protocolo CORT foi capaz de causar um comportamento tipo-ansioso no TCA, verificado pela diminuição do tempo de permanência dos animais no centro do aparato, o qual foi prevenido pelo tratamento com AU e fluoxetina, indicando um possível efeito tipo-ansiolítico do AU. De acordo, outros trabalhos demonstram que a fluoxetina, assim como compostos benzodiazepínicos, é capaz de reverter comportamentos tipo-ansiosos no TCA, incluindo a redução do tempo de permanência no centro do campo aberto induzida pelo CORT (CHOLERIS et al., 2001; DAVID et al., 2009; JINDAL, MAHESH e BHATT, 2013).

Em humanos, a disfunção do eixo HPA parece ser responsável por grande parte das alterações encontradas na depressão, resultando na produção e liberação prolongada de cortisol, hormônio relacionado ao estresse, e conseqüente quebra da ritimicidade do eixo HPA (SACHAR e BARON, 1979; PALAZIDOU, 2012). Esta situação é mimetizada em roedores pela administração repetida de corticosterona exógena, causando alterações comportamentais, bioquímicas e fisiológicas relacionadas aos transtornos de depressão e ansiedade (AGO et al., 2008; MURRAY, SMITH e HUTSON, 2008; DAVID et al., 2009; GOURLEY e TAYLOR, 2009; STERNER e KALYNCHUK, 2010; KOIKE, IJIMA e CHAKI, 2013; OLAUSSON et al., 2013). Além disso, a desregulação do eixo HPA coincide com episódios depressivos e pode ser parcialmente revertida após o tratamento com antidepressivos (FASSBENDER et al., 1998). Nossos resultados demonstram que após o protocolo CORT os níveis séricos de corticosterona encontram-se abruptamente diminuídos, revelando uma disruptura do eixo HPA. Essa alteração foi parcialmente prevenida pelo tratamento com fluoxetina, mas não com AU. Embora a literatura demonstre que a administração repetida de corticosterona possa causar aumento nos níveis de corticosterona em camundongos (MURRAY, SMITH e HUTSON, 2008), ou até mesmo não causar alterações neste parâmetro (MURRAY, SMITH e HUTSON, 2008; XU et al., 2011), resultados semelhantes aos encontrados neste trabalho, no qual a administração repetida de corticosterona resultou em uma diminuição dos níveis deste glicocorticóide em camundongos, também são encontrados em outros trabalhos da literatura (AGO et al., 2008; HOWELL, KUTIYANAWALLA e PILLAI, 2011; ROSA et al., 2014). Estas diferenças apresentadas na literatura podem ocorrer possivelmente devido à dose de corticosterona utilizada no protocolo, à via de administração (subcutânea, i.p., implantação de pellet, bomba osmótica

de infusão, administração passiva através da água ou comida, administração oral por gavagem), espécie (ratos ou camundongos) e linhagem utiliza, assim como tempo de exposição/administração (dias, semanas ou meses) e horário da coleta de sangue (STERNER e KALYNCHUK, 2010). Cabe destacar que a condição de diminuição nos níveis de glicocorticoides é encontrada em pacientes com depressão atípica e sazonal, bem como está fortemente relacionada à depressão associada ao transtorno de estresse pós-traumático, podendo estar relacionado a um estado de fadiga adrenal (GOLD et al., 1995; GOLD e CHROUSOS, 2002; OQUENDO et al., 2003).

A redução do volume do córtex pré-frontal é uma das alterações que podem ser encontradas em pacientes depressivos (BREMNER, 2002), podendo estar relacionada com a diminuição de fatores tróficos (COTTER et al., 2002; NESTLER et al., 2002; CASTREN, 2004; KRISHNAN e NESTLER, 2008; PARADISE et al., 2012). De acordo, diferentes estudos em roedores mostram que a administração repetida de corticosterona pode causar uma diminuição nos níveis de BDNF em diferentes estruturas encefálicas relacionadas ao comportamento depressivo, como o córtex pré-frontal (HUANG et al., 2011; MAO et al., 2012). Os resultados deste trabalho mostram que a administração repetida de corticosterona (21 dias, 20 mg/kg, p.o.) causou uma diminuição dos níveis de BDNF no córtex pré-frontal dos camundongos. Adicionalmente, o tratamento repetido com AU, assim como com fluoxetina, preveniu a redução dos níveis de BDNF, reforçando o efeito tipo-antidepressivo do AU e demonstrando seu papel na manutenção dos níveis de BDNF no córtex pré-frontal dos camundongos submetidos a administração repetida de corticosterona. Em acordo, o tratamento repetido com antidepressivos de diferentes classes, incluindo ISRS's, ISRN's e ATC's, é capaz de impedir alterações relacionadas à depressão causadas pela exposição repetida a corticosterona em animais (DAVID et al., 2009; RAINER et al., 2012b).

O protocolo CORT é capaz de induzir comportamento tipo-depressivo e também tipo-ansioso em roedores, os quais podem ser revertidos pela administração de antidepressivos (MURRAY, SMITH e HUTSON, 2008; DAVID et al., 2009), e, de fato, transtornos de ansiedade e depressão constituem-se na comorbidade psiquiátrica mais prevalente (BROWN et al., 2001). Os resultados apresentados neste estudo demonstram o efeito tipo-antidepressivo e tipo-ansiolítico do AU, uma vez que foi capaz de prevenir o comportamento tipo-depressivo do protocolo CORT no TSC e TCS e tipo-ansioso no TCA.

Estes dados somam-se aos outros trabalhos que demonstram o efeito tipo-antidepressivo do AU no TSC, TNF (MACHADO et al., 2012c) (capítulo 1 e 2) e reforçam o efeito tipo-antidepressivo do AU em camundongos bem como a necessidade de investigações futuras sobre os efeitos biológicos deste composto, principalmente referentes ao seu potencial antidepressivo e ansiolítico e aos mecanismos envolvidos nestes efeitos.

CAPÍTULO 4. EFEITO TIPO-ANSIOLÍTICO CAUSADO PELA ADMINISTRAÇÃO AGUDA DE ÁCIDO URSÓLICO EM CAMUNDONGOS

A administração de AU apresenta diferentes efeitos neurofarmacológicos em roedores, incluindo proteção contra déficits cognitivos induzidos por diferentes agentes (LU et al., 2011; WANG, Y. J. et al., 2011; WU, D. M. et al., 2013), efeito antinociceptivo (VERANO et al., 2013), efeito neuroprotetor (LI et al., 2013), assim como efeito tipo-antidepressivo do tratamento agudo e repetido, juntamente com a capacidade de impedir a indução do comportamento tipo-depressivo por diferentes protocolos experimentais, como demonstrado nos capítulos anteriores e trabalho prévio de nosso grupo de pesquisa (MACHADO et al., 2012c).

A depressão e a ansiedade possuem uma alta taxa de comorbidade e parecem compartilhar diversos aspectos patológicos (POLLACK, 2005; HETTEMA, 2008). Dentre os resultados apresentados no capítulo 3, uma das alterações comportamentais encontradas no TCA, a diminuição do tempo de permanência no centro do aparato, está associada a um possível efeito ansiogênico de protocolos de indução de depressão baseados no estresse (CHOLERIS et al., 2001; DAVID et al., 2009; HAMMACK et al., 2009; JINDAL, MAHESH e BHATT, 2013). Esta alteração foi prevenida pelo tratamento com AU demonstrando um possível efeito tipo-ansiolítico deste composto.

Os transtornos de ansiedade são a condição psiquiátrica mais comum atendida por profissionais de cuidado primário, com prevalência estimada em 13% (KESSLER et al., 2005). Estes pacientes representam custo significativo em cuidados de saúde, além de perda de produtividade, incapacidade e diminuição de qualidade de vida (COMBS e MARKMAN, 2014). Ainda, o risco de suicídio é elevado em transtornos de ansiedade agudos ou crônicos (KHAN et al., 2002). Os efeitos colaterais da medicação atual constituem-se em uma barreira a aderência e ao sucesso do tratamento e demonstram a necessidade da busca por novas alternativas de tratamento (THRONSON e PAGALILAUAN, 2014).

Para estudar as bases neurobiológicas dos transtornos de ansiedade e buscar assim novos alvos e estratégias terapêuticas, diferentes testes comportamentais podem ser utilizados, dentre os quais se destacam o TCA, o labirinto em cruz elevado (LCE), a caixa claro/escuro (CCE) e o teste de esconder esferas (TEE) como alguns dos

mais comumente utilizados em roedores (ENNACEUR, 2014; KEDIA e CHATTARJI, 2014).

O tratamento de primeira escolha para os transtornos de ansiedade visa prevenir sintomas futuros e consiste no uso de antidepressivos que agem inibindo a recaptação de 5-HT, NE ou ambos (COMBS e MARKMAN, 2014; THRONSON e PAGALILAUAN, 2014). O AU teve seu efeito tipo-antidepressivo em camundongos associado à participação do sistema monoaminérgico e uma possível capacidade de inibir a recaptação de monoaminas (Capítulo 1) (MACHADO et al., 2012c), bem como um possível efeito tipo-ansiolítico (Capítulo 3). Portanto, este estudo objetivou investigar um possível efeito tipo-ansiolítico da administração de AU em diferentes testes comportamentais, o TCA, LCE, CCE e o TEE.

4.1. Material e métodos

4.1.1. Animais e tratamento

Foram utilizados camundongos Swiss machos (40-50 g, de aproximadamente 60 dias de idade), mantidos em condição padrão de biotério (20-22°C), com livre acesso a água e comida, em ciclo claro/escuro de 12:12 horas (luzes acessas as 07:00 horas). Os animais foram aclimatizados na sala de experimentação 24 horas antes dos testes comportamentais e os experimentos foram realizados no ciclo claro (n=8). Os experimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Catarina (protocolo n° PP00795). O AU (0,1; 1 e 10 mg/kg) (Sigma Aldrich) e o Diazepam (DZP) (2 mg/kg, controle positivo) (Roche) foram dissolvidos em água destilada com 10% de Tween 80. O grupo controle recebeu água destilada com 10% de Tween 80. As administrações foram realizadas 1 hora antes dos testes comportamentais.

4.1.2. Teste do campo aberto (TCA)

O teste foi realizado conforme descrito no item 2.1.6 (capítulo 2). Além dos parâmetros de cruzamentos, o tempo no centro e na periferia, o número de autolimpezas e o número levantamentos verticais também foram contabilizados como medidas de ansiedade (KALUEFF, JENSEN e MURPHY, 2007; MACHADO et al., 2012a).

4.1.3. Labirinto em cruz elevado (LCE)

O aparato (Figura 4.1) é um labirinto composto por uma plataforma central (6 x 6 cm), dois braços abertos (30 x 6 cm) alinhados perpendicularmente com dois braços fechados (30 x 6 x 16 cm). O labirinto é elevado 50 cm acima do chão e os braços abertos possuem uma elevação lateral de 1 cm para prevenir possíveis quedas do animal. Os camundongos foram individualmente colocados no centro do aparato, com a face entre o braço aberto e o fechado, e o comportamento avaliado durante 5 minutos. A porcentagem de entradas e tempo despendido nos braços abertos foi mensurada como medidas de ansiedade, onde um aumento das entradas ou do tempo de permanência representa um efeito tipo-ansiolítico do composto avaliado (BUDZYNSKA et al., 2013; LAPMANEE, CHAROENPHANDHU e CHAROENPHANDHU, 2013). O aparato foi limpa com solução de álcool 10% entre os testes.

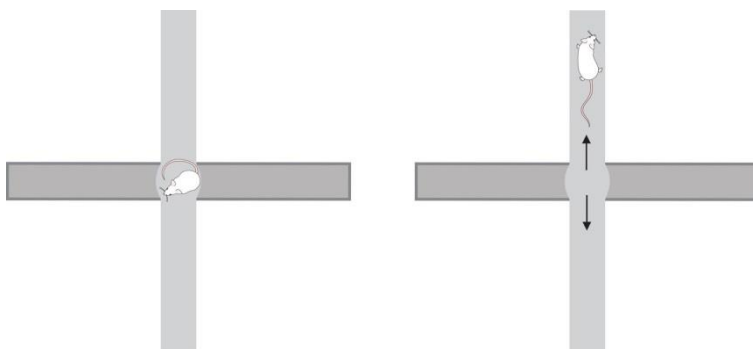


Figura 4. 1. Teste do labirinto em cruz elevado (LCE).

Os animais são colocados no centro do aparato e a porcentagem de entradas e tempo total de permanência nos braços abertos é avaliada como parâmetro de ansiedade por um período de 5 minutos. Fonte: Do autor.

4.1.4. Caixa claro-escuro (CCE)

O aparato consiste em uma caixa (46x20x30) dividida em 2 compartimentos, $\frac{1}{3}$ escuro e $\frac{2}{3}$ claro, interconectados entre si (Figura 4.2). O teste é baseado no fato de que roedores de hábitos noturnos como camundongos possuem uma tendência natural em explorar novos ambientes, neste teste a área segura consiste no compartimento escuro e a área aversiva no compartimento claro (BOURIN e HASCOET, 2003). Para a realização do teste, os camundongos foram colocados no

compartimento claro do aparato e a latência para a primeira entrada no compartimento escuro bem como o tempo total de permanência no compartimento claro foram mensurados como parâmetros de ansiedade durante um período de 5 minutos. Compostos ansiolíticos aumentam o tempo de latência para a primeira entrada no compartimento escuro, assim como o tempo total de permanência no compartimento claro (COSTALL et al., 1989; IMAIZUMI, MIYAZAKI e ONODERA, 1994; BOURIN e HASCOET, 2003). A base do aparato foi limpa com solução de álcool 10% entre os testes.

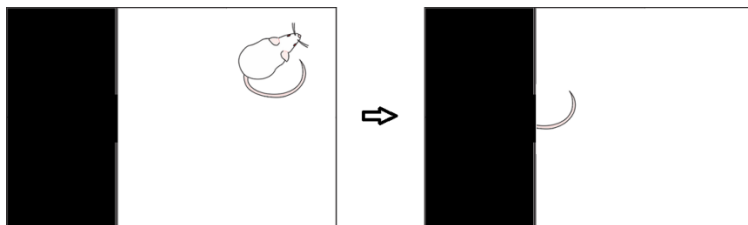


Figura 4. 2. Teste da caixa claro/escuro (CCE).

O animal é colocado no compartimento claro (iluminado) da caixa. A latência para a entrada no compartimento escuro e o tempo total no compartimento claro são contabilizados por um período de 5 minutos. Fonte: Do autor.

4.1.5. Teste de esconder esferas (TEE)

Para a realização deste teste foi utilizada uma caixa (17,5x10x5,5) preenchida com maravalha em aproximadamente 5 cm de altura distribuída uniformemente ao longo da caixa. 20 esferas de vidro (1,4 cm de diâmetro) foram colocadas espaçadamente formando fileiras de 4x5 na superfície da maravalha. Durante o teste cada animal foi colocado individualmente em cada caixa e pode explorar o ambiente por um período de 20 minutos (Figura 4.3). Ao final do teste, os animais foram retirados e o número total de esferas escondidas (mais de $\frac{2}{3}$ da superfície da esfera enterrada) foi contabilizado (KEDIA e CHATTARJI, 2014). Roedores utilizam material (maravalha) para enterrar e esconder objetos aversivos e a inibição deste comportamento é considerada um perfil ansiolítico (ALBELDA e JOEL, 2012).

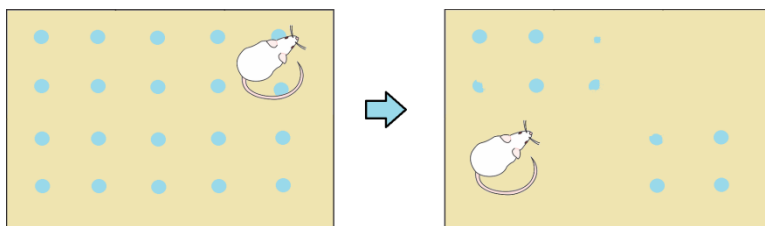


Figura 4. 3. Teste de esconder esferas (TEE).

O animal é colocado em uma caixa preenchida uniformemente com 5 cm de altura de maravalha e contendo 20 esferas de vidro paralelamente distribuídas. Após o período de 20 minutos é contabilizado o total de esferas escondidas (mais de $\frac{2}{3}$ da superfície da esfera enterrada). Fonte: Do autor.

4.1.6. Análise estatística

Os resultados foram analisados por análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida de teste post hoc de Newman-Keuls quando apropriado. Foram considerados significativos valores de $p < 0,05$.

4.2. Resultados

4.2.1. Efeito da administração aguda de AU no TCA

Os resultados apresentados na Figura 4.4A mostram primeiramente que tanto a administração de AU quanto de DZP não causaram alterações na locomoção espontânea dos camundongos. O tempo total de permanência no centro do aparato foi elevado, assim como o número total de levantamentos verticais foi reduzido pela administração de AU (10 mg/kg) de maneira semelhante ao DZP (2 mg/kg, controle positivo) (Figuras 4.4B e 4.4C). O número total de autolimpezas foi reduzido apenas pela administração de DZP (Figura 4.4D). A ANOVA de uma via não mostrou efeito significativo do tratamento [$F(4,35)=1,95$, $p=0,12$] para o número total de cruzamentos, um efeito significativo do tratamento [$F(4,35)=3,94$, $p < 0,01$] para o tempo total no centro, um efeito significativo do tratamento [$F(4,35)=6,48$, $p < 0,01$] para o número de levantamentos verticais e um efeito significativo do tratamento [$F(4,35)=4,62$, $p < 0,01$] para o número de autolimpezas no TCA.

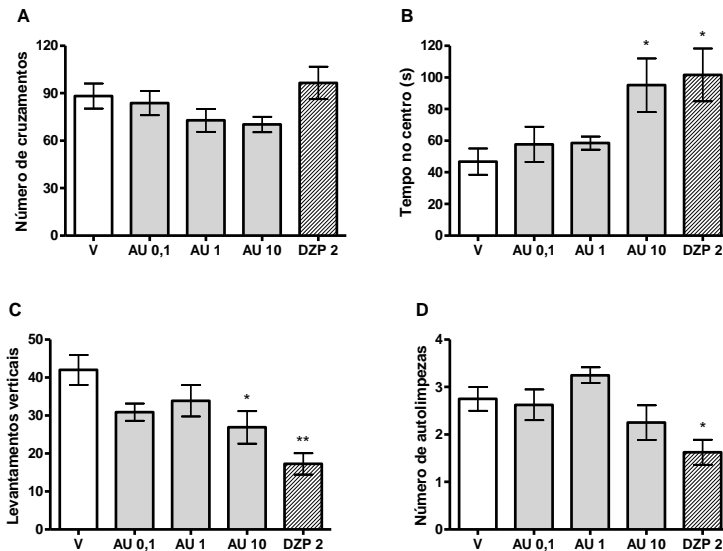


Figura 4. 4. Efeito da administração aguda de AU no TCA.

Efeito do tratamento agudo com diferentes doses de AU (0,1; 1 e 10 mg/kg) e DZO (2 mg/kg) no número de cruzamentos (A), tempo de permanência no centro (B), número de levantamentos verticais (C) e número de autolimpezas (D) no TCA. Os valores estão expressos em média \pm E.P.M. (n=8). * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ quando comparado ao veículo (V). ANOVA de uma via seguida de teste post hoc de Newman-Keuls.

4.2.2. Efeito da administração aguda de AU no LCE

Os resultados apresentados na Figura 4.5 mostram que tanto o tratamento agudo com AU (10 mg/kg) quanto com DZP (2 mg/kg) foram capazes de aumentar a porcentagem do número total de entradas (A) e do tempo total de permanência (B) no braço aberto do LCE. A ANOVA de uma via mostrou efeito significativo do tratamento [$F(4,35)=3,16$, $p<0,05$] para o número de entradas nos braços abertos e efeito significativo do tratamento [$F(4,35)=4,76$, $p<0,05$] para o tempo total de permanência nos braços abertos do LCE.

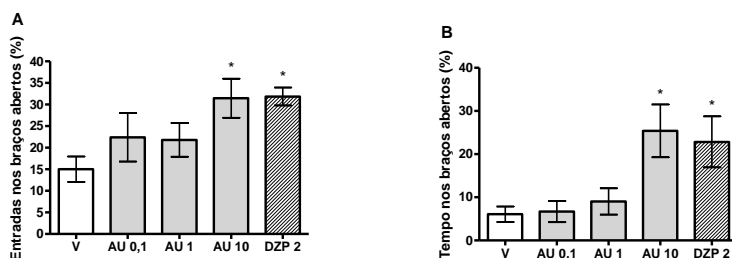


Figura 4. 5. Efeito da administração aguda de AU no LCE.

Efeito do tratamento agudo com diferentes doses de AU (0,1; 1 e 10 mg/kg) e DZP (2 mg/kg) na porcentagem de entradas (A) e do tempo total de permanência nos braços abertos (B) no LCE. Os valores estão expressos em média \pm E.P.M. (n=8). * $p<0,05$ quando comparado ao veículo (V). ANOVA de uma via seguida de teste post hoc de Newman-Keuls.

4.2.3. Efeito da administração aguda de AU na CCE

A Figura 4.6 mostra que o tratamento com AU (e ambas as doses) não foi capaz de alterar os parâmetros analisados na CCE. O controle positivo, DZP (2 mg/kg), aumentou a latência para a primeira entrada no lado escuro da caixa (A) e o tempo total de permanência no lado claro da caixa (B). A ANOVA de uma via mostrou efeito significativo do tratamento [$F(4,35)=3,50$, $p<0,05$] para o tempo de latência para a primeira entrada no compartimento escuro e um efeito significativo do tratamento [$F(4,35)=3,62$, $p<0,05$] para o tempo total de permanência no lado claro da caixa na CCE.

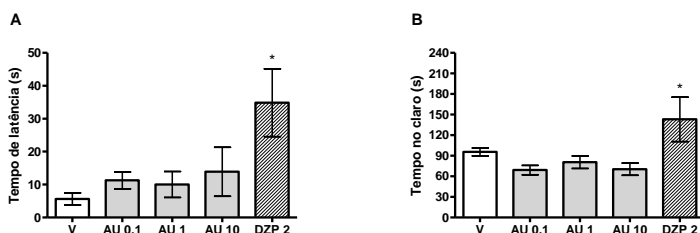


Figura 4. 6. Efeito da administração aguda de AU na CCE.

Efeito do tratamento agudo com diferentes doses de AU (0,1; 1 e 10 mg/kg) e DZP (2 mg/kg) na latência para primeira entrada no compartimento escuro (A) e no tempo total de permanência no compartimento claro (B) na CCE. Os valores estão expressos em média \pm E.P.M. (n=8). * $p<0,05$ quando comparado ao veículo (V). ANOVA de uma via seguida de teste post hoc de Newman-Keuls.

4.2.4. Efeito da administração aguda de AU no TEE

A Figura 4.7 mostra que o tratamento com AU (ambas as doses) não foi capaz de alterar o número total de esferas escondidas no TEE. O tratamento com DZP (2 mg/kg) diminuiu significativamente o número de esferas escondidas neste teste. A ANOVA de uma via mostrou efeito significativo do tratamento [$F(4,35)=3,65$, $p<0,05$] para o número total de esferas escondidas no TEE.

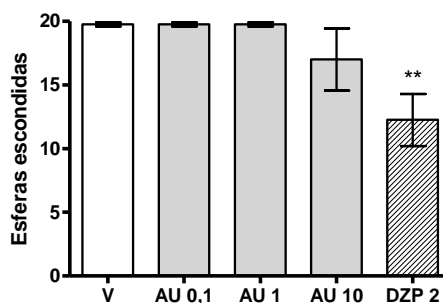


Figura 4. 7. Efeito da administração aguda de AU no TEE.

Efeito do tratamento agudo com diferentes doses de AU (0,1; 1 e 10 mg/kg) e DZP (2 mg/kg) no número total de esferas escondidas no TEE. Os valores estão expressos em média \pm E.P.M. ($n=8$). ** $p<0,01$ quando comparado ao veículo (V). ANOVA de uma via seguida de teste post hoc de Newman-Keuls.

4.3 Discussão

Os transtornos de ansiedade constituem-se em condições psiquiátricas que afetam diretamente a realização de atividades diárias e representam um alto custo para os sistemas públicos de saúde (CAMPOS et al., 2013a; COMBS e MARKMAN, 2014). Considerando os custos em termos de debilidade e associados aos encargos financeiros, em conjunto com o aumento no risco de suicídio, a busca por novas e efetivas alternativas para o tratamento dos transtornos de ansiedade é uma necessidade constante (COMBS e MARKMAN, 2014). Apesar de existirem algumas limitações, o uso de modelos animais é uma importante ferramenta para a investigação da neurobiologia dos transtornos de ansiedade e relacionados (CAMPOS et al., 2013a). Dentre os diferentes testes comportamentais para avaliar o comportamento tipo-ansioso, o TCA, o LCE e a CCE são os mais

comumente utilizados (KLIETHERMES, 2005). Neste estudo, um possível efeito tipo-ansiolítico da administração de AU foi avaliado em diferentes testes comportamentais. Os resultados demonstram que a administração aguda de AU (10 mg/kg) produz efeito tipo-ansiolítico em camundongos em parâmetros avaliados no TCA e no LCE. De fato, a dose que apresentou efeito tipo-ansiolítico neste trabalho é a mesma que apresenta outros efeitos neurofarmacológicos como efeito tipo-antidepressivo no TNF (MACHADO et al., 2012c), e propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias em camundongos (LU et al., 2007; LU et al., 2010).

O TCA é uma ferramenta bastante utilizada para avaliar efeitos comportamentais da administração de compostos, principalmente em parâmetros locomotores e ansiosos (RODRIGUES et al., 1996; CHOLERIS et al., 2001). Para avaliar o efeito dos tratamentos (AU e DZP) na atividade locomotora, este trabalho mensurou o número de quadrantes cruzados no TCA. Nenhum tratamento causou alteração na locomoção espontânea dos animais, descartando assim que um possível efeito psicoestimulante ou locomotor poderia ter influenciado nos resultados relacionados aos parâmetros de ansiedade avaliados neste e nos outros testes comportamentais utilizados. Além da locomoção, o TCA permite verificar comportamentos relacionados a ansiedade, visto que compostos ansiolíticos levam a um aumento no tempo total de permanência dos animais no centro do aparato e uma diminuição no número de respostas de autolimpeza e levantamentos verticais (KALUEFF, JENSEN e MURPHY, 2007; MACHADO et al., 2012a). Os resultados deste trabalho mostram que a administração de AU, na dose de 10 mg/kg, de forma similar ao DZP (2 mg/kg), foi capaz de causar um aumento no tempo total de permanência dos camundongos no centro do TCA, assim como em uma redução no número de levantamentos verticais, demonstrando assim um efeito tipo-ansiolítico do AU. O número de respostas de autolimpeza foi reduzido apenas pela administração de DZP. De fato, uma redução de autolimpeza é frequentemente observada em animais tratados com compostos ansiolíticos, porém, este comportamento tem sido proposto como um parâmetro mais especificamente relacionado com o transtorno obsessivo compulsivo (TOC) do que com ansiedade generalizada (TING e FENG, 2011).

Para reforçar um possível efeito tipo-ansiolítico do AU, sua administração foi também avaliada no LCE, o qual é considerado um dos mais bem estabelecidos testes e padrão de referência em detecção de efeitos ansiolíticos e ansiogênicos (HOGG, 1996). De maneira similar

ao TCA, o LCE é baseado no conflito natural entre explorar um ambiente novo e a tendência em evitar áreas potencialmente perigosas (RAMOS, 2008). A literatura demonstra que os parâmetros mais relacionados ao efeito ansiolítico de compostos avaliados no LCE são o aumento na porcentagem de entradas, bem como no tempo total despendido nos braços abertos do aparato (RODGERS e DALVI, 1997; JINDAL, MAHESH e BHATT, 2013). Nossos resultados demonstram que a administração aguda de AU (10 mg/kg), mesma dose que apresentou efeito ansiolítico no TCA, também apresentou este efeito no LCE, verificado pelo aumento na porcentagem de entradas e de permanência nos braços abertos do aparato, de forma similar ao DZP, utilizado como controle positivo neste teste. O LCE pode ser considerado uma ferramenta bastante eficaz na busca por compostos ansiolíticos e no estudo da neurobiologia da ansiedade (RODGERS e DALVI, 1997), desta forma os resultados do LCE reforçam o efeito tipo-ansiolítico da administração de AU em camundongos.

A CCE é um teste comportamental baseado na aversão inata de roedores a ambientes muito iluminados, gerando um conflito entre uma tendência em explorar ambientes e a aversão ao compartimento claro do aparato (CAMPOS et al., 2013a). Neste trabalho, nenhuma dose de AU foi capaz de produzir efeito ansiolítico na CCE. A administração de DZP causou um aumento na latência para a primeira entrada no compartimento escuro, bem como no tempo total de permanência no compartimento claro da caixa, demonstrando assim um efeito ansiolítico. De fato, a administração de ansiolíticos é capaz de aumentar a latência para a entrada no lado menos aversivo da caixa e um aumento no tempo despendido no compartimento claro (KLIETHERMES, 2005). Entretanto, a ação de compostos benzodiazepínicos é mais facilmente detectável neste teste em comparação a compostos com perfil antidepressivo, especialmente drogas que atuam no sistema serotoninérgico, as quais demonstram uma menor ou não responsividade a CCE em camundongos (BOURIN e HASCOET, 2003). De fato, o AU possui efeito tipo-antidepressivo demonstrado em diferentes testes comportamentais e seus efeitos parecem ser mediados, ao menos em parte, pelo sistema serotoninérgico (Capítulo 1) o que poderia explicar a falta de responsividade da administração de AU na CCE. Além disso, o AU é capaz de inibir a enzima monoamina oxidase B (KIM, KIM e HWANG, 2012), e a literatura mostra que inibidores de monoamina oxidase B, como por exemplo a selegilina, podem não apresentar efeito tipo-ansiolítico neste teste (DE ANGELIS e FURLAN, 2000).

Roedores costumam utilizar material de ninho para enterrar e esconder objetos considerados nocivos, assim como objetos inofensivos, e a inibição do comportamento de esconder objetos é sugerido como uma resposta comportamental relacionada à atividade ansiolítica de compostos (ALBELDA e JOEL, 2012). Neste trabalho, a administração de AU não demonstrou perfil ansiolítico no TEE, uma vez que não causou uma diminuição no comportamento de enterrar e esconder esferas. Vale ressaltar que a administração de AU exibiu efeitos ansiolíticos tanto no TCA quanto no LCE, mas não na CCE ou no TEE. De fato, o TEE tem sido sugerido como um teste mais específico para o estudo do transtorno obsessivo compulsivo do que de ansiedade generalizada (KALUEFF, WHEATON e MURPHY, 2007; ALBELDA e JOEL, 2012). Notavelmente, a administração de AU, além de não demonstrar efeito ansiolítico no TEE, também não causou alterações no número de respostas de autolimpeza no TCA, um comportamento que também tem sido proposto como relacionado ao transtorno obsessivo compulsivo (GRAYBIEL e SAKA, 2002; FINEBERG et al., 2011). Apesar de o TCA, o LCE, a CCE e o TEE serem creditados em mensurar comportamentos relacionados à ansiedade em roedores, é possível que estes testes comportamentais detectem diferentes aspectos na natureza complexa e multifacetada dos transtornos de ansiedade, uma vez que os mecanismos neurobiológicos das respostas comportamentais em cada teste podem ser diferentes (GAVIOLI et al., 2007; KALUEFF, WHEATON e MURPHY, 2007; ALBELDA e JOEL, 2012; KEDIA e CHATTARJI, 2014). De acordo com essa hipótese, este trabalho demonstra a relevância da utilização de diferentes paradigmas comportamentais na avaliação da ação ansiolítica de compostos.

Em conjunto, os resultados deste capítulo, demonstram pela primeira vez o efeito tipo-ansiolítico da administração de AU (10 mg/kg), a qual foi capaz de prevenir comportamentos tipo-ansiosos no TCA e no LCE, testes comportamentais muito utilizados na pesquisa de compostos ansiolíticos. Estudos pré-clínicos demonstram que não apenas compostos benzodiazepínicos, mas também antidepressivos, reduzem de maneira consistente comportamentos tipo-ansiosos de roedores nestes paradigmas (CHOLERIS et al., 2001; BOURIN e HASCOET, 2003; JINDAL, MAHESH e BHATT, 2013). De fato, o AU teve seu efeito tipo-antidepressivo, relacionado a participação dos sistemas monoaminérgicos, demonstrado neste trabalho (Capítulo 1), e em trabalho prévio (MACHADO et al., 2012c). O diagnóstico de depressão é fortemente associado à presença de outros transtornos, principalmente de transtornos de ansiedade, sendo essa a mais

prevalente comorbidade psiquiátrica (HECHT, VON ZERSEN e WITTCHEN, 1990; BROWN et al., 2001). Os ISRSs e inibidores da recaptção de 5-HT e NE são capazes de prevenir sintomas de ansiedade, reduzindo o risco de recorrência e possuindo um perfil mais seguro quando comparado com os benzodiazepínicos, os quais não conferem benefícios preventivos (BALDWIN, WALDMAN e ALLGULANDER, 2011; THRONSON e PAGALILAUAN, 2014). Considerando a alta taxa de comorbidade ansiedade/depressão e a necessidade de novas alternativas farmacológicas mais eficazes para o tratamento desta condição, o perfil tipo-antidepressivo previamente demonstrado e os efeitos ansiolíticos do AU sugerem que o perfil farmacológico do AU pode oferecer uma nova estratégia terapêutica para o tratamento da comorbidade ansiedade/depressão.

Este capítulo originou o Artigo: Colla, A.R.S.; Rosa, J.M.; Cunha, M.P.; Rodrigues, A.L. Anxiolytic-like effects of ursolic acid in mice. *Eur J Pharmacol*, v. 758, p. 171-76, 2015.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O AU exerce efeito tipo-antidepressivo dependente da participação dos sistemas serotoninérgico, noradrenérgico e dopaminérgico, sendo possível que ele possa agir inibindo a recaptação dessas monoaminas e/ou inibindo enzimas de degradação de monoaminas (HWANG, 2003; HWANG e PARK, 2007; KIM, KIM e HWANG, 2012; MACHADO et al., 2012c). De fato, uma das estratégias na busca por compostos mais eficazes para o tratamento da depressão e que vem apresentando resultados positivos na prática clínica é a utilização de drogas que atuem em múltiplos alvos farmacológicos (OF, DINAN e CRYAN, 2014). A intervenção clínica buscando a inibição tripla de recaptação de monoaminas vem sendo vista como uma estratégia para uma resposta mais efetiva e que necessite de menor tempo de resposta terapêutica em relação ao tratamento com inibidores seletivos ou duais (LIANG et al., 2008). Uma prática clínica utilizada neste sentido é o acréscimo da bupropiona, inibidor da recaptação de DA, ao tratamento com venlafaxina, inibidor da recaptação de 5-HT e NE (ANDRADE, 2013), porém os riscos farmacocinéticos, como um aumento da pressão arterial, deste tipo de estratégia faz com que seja mais vantajosa a utilização de um único agente com a capacidade de atuar como inibidor triplo de recaptação de monoaminas do que a administração conjunta de mais de um fármaco (ANDRADE, 2013; OF, DINAN e CRYAN, 2014). Neste contexto, o AU surge como um composto promissor, tendo em vista a participação dos sistemas monoaminérgicos no seu efeito tipo-antidepressivo, aliado ao fato de seu perfil farmacológico considerado seguro quanto a sua toxicidade (LIU, 1995; NOVOTNY, VACHALKOVA e BIGGS, 2001; AGGARWAL, TAKADA e OOMMEN, 2004; CHEN et al., 2011; ALVARADO et al., 2015).

Em acréscimo aos testes comportamentais de validade preditiva como o TSC e o TNF, os quais permitem a avaliação farmacológica de compostos, existem os modelos animais de indução de comportamento tipo-depressivo, mimetizando sintomas e também alterações neuroquímicas da doença. A pesquisa utilizando modelos animais de depressão, como o ECI e o CORT, tende a apresentar resultados mais robustos e permite verificar diferentes alvos relacionados à patologia e ao efeito do composto testado (NESTLER et al., 2002; PALAZIDOU, 2012). Dentre os diferentes modelos propostos, aqueles baseados no estresse destacam-se por apresentar uma ampla gama de alterações relacionadas à depressão. O estresse parece mesmo ser um dos

principais, senão o principal fator responsável pelo desencadeamento do estado depressivo em humanos, e, em animais, os protocolos baseados na exposição a fatores estressantes bem como na administração de glicocorticoides demonstram resultados bastante robustos e passíveis de serem prevenidos pela administração de diferentes classes de antidepressivos (ANISMAN e MATHESON, 2005; HAMMEN, 2005; HORESH, KLOMEK e APTER, 2008; DAVID et al., 2009; OLAUSSON et al., 2013). Este trabalho demonstra a capacidade da administração repetida de AU em prevenir diferentes alterações comportamentais relacionadas à depressão e avaliadas em diferentes testes comportamentais. Ainda, em prevenir alterações bioquímicas relacionadas a esta doença, como o aumento no RNAm da proteína pró-apoptótica Bax e diminuição da razão Bcl-2/Bax no hipocampo causadas pelo ECI e a diminuição nos níveis de BDNF no córtex pré-frontal causada pelo protocolo CORT. Em conjunto, os resultados reforçam a capacidade deste composto em exercer efeito tipo-antidepressivo em testes e modelos animais e fornecem robustez à ideia de que o AU necessita ter seus mecanismos de ação melhor investigados visando uma possível utilização na prática clínica.

Ademais, sabe-se que a depressão pode coexistir também com outras doenças, tais como a ansiedade, apresentando altas taxas de comorbidade com o diagnóstico do transtorno de ansiedade e podendo até mesmo compartilhar diferentes aspectos fisiopatológicos com esta doença (POLLACK, 2005; HETTEMA, 2008). Ainda, quando a depressão e a ansiedade ocorrem em conjunto, estão associadas com sintomas mais graves, aumento dos prejuízos causados pelas doenças, um curso mais crônico, um menor êxito do tratamento e até mesmo uma maior incidência de suicídio, piorando fortemente o quadro do paciente (BAKISH, 1999; FAVA et al., 2000). Este trabalho demonstra também um efeito tipo-ansiolítico do AU, verificado em diferentes testes comportamentais, o TCA e o LCE, e acentua ainda mais a necessidade de estudos mais aprofundados quanto aos efeitos biológicos do AU, uma vez que um possível efeito ansiolítico fortalece a proposta de sua utilização em doenças que possuem alta comorbidade com os transtornos de ansiedade como a depressão. Além disso, cabe destacar que o AU é amplamente estudado em relação a seus efeitos antitumorais (LIU, 1995), e a depressão também possui uma elevada taxa de comorbidade com o câncer, o qual, por sua vez, também pode coexistir com transtornos de ansiedade em grande parte dos pacientes (SARFATI et al., 2014; ZHU et al., 2014), abrindo assim uma nova e importante perspectiva em relação ao estudo dos efeitos biológicos do AU.

Por fim, as alternativas para o tratamento da depressão parecem, ao longo do tempo, caminhar no sentido a reduzir a incidência de efeitos secundários indesejados e buscar novos alvos de ação. A tolerabilidade parece ter melhorado, mas as diferenças em relação à eficácia clínica não parecem ser facilmente detectáveis. Ainda, as melhorias nas taxas de resposta e no início lento do efeito clínico podem ser consideradas como os principais pontos que indicam a necessidade da busca por novos medicamentos (WILLNER, SCHEEL-KRUGER e BELZUNG, 2013). Em conjunto, os resultados encontrados neste estudo embasam a teoria de que o AU apresenta efeito tipo-antidepressivo e demonstram também seu efeito tipo-ansiolítico. A capacidade do AU de exercer efeito tipo-antidepressivo em diferentes testes comportamentais e impedir alterações bioquímicas e comportamentais relacionadas à depressão em diferentes e bem estabelecidos modelos animais (Figura 9) fortalece a necessidade de estudos mais aprofundados a cerca dos mecanismos de ação relacionados aos seus efeitos.

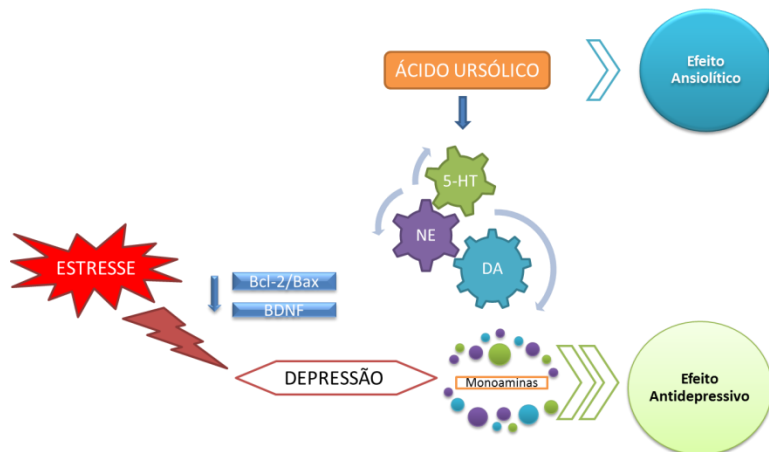


Figura 9. Resumo gráfico.

Proposta de ação do AU baseada na resposta aos diferentes modelos, testes e ferramentas farmacológicas utilizadas. O AU parece exercer efeito tipo-antidepressivo relacionado com o sistema monoaminérgico, tanto em testes comportamentais preditivos quanto em modelos de indução de comportamento tipo-depressivo baseados no estresse em camundongos. Demonstra capacidade de proteger contra a redução da razão Bcl-2/Bax no hipocampo e de BDNF no córtex pré-frontal induzida por modelos de estresse. Ainda, possui efeito ansiolítico demonstrado no TCA e LCE. Em vista de seus efeitos biológicos junto a efeitos neuroprotetores demonstrados na literatura, demonstra ser um importante alvo de estudos quanto aos seus efeitos benéficos em doenças como depressão e ansiedade. Fonte: Do autor.

5. CONCLUSÕES

Este estudo demonstra o efeito tipo-antidepressivo da administração oral de AU em camundongos. A administração aguda de AU (0,1 mg/kg, p.o.) apresenta efeito tipo-antidepressivo no TSC sem causar alterações locomotoras no TCA. O efeito tipo-antidepressivo do AU parece depender de uma interação com os sistemas serotoninérgico e noradrenérgico, mas não com os sistemas glutamatérgico e opióide. Além disso, o efeito somatório encontrado quando administrado em dose sub-efetiva (0,001 mg/kg, p.o.) em conjunto com doses sub-efetivas dos antidepressivos fluoxetina e reboxetina, sugerem que este composto pode também potencializar a efetividade dos antidepressivos disponíveis no mercado.

A administração repetida de AU (0,1 mg/kg, p.o.) também apresentou efeito tipo-antidepressivo, bem como foi capaz de proteger do comportamento tipo-depressivo (aumento no tempo de imobilidade no TSC e no tempo de latência para autolimpeza no TBS) induzido pelo protocolo do ECI. O AU também demonstrou potencial anti-apoptótico, uma vez que protegeu do aumento no RNAm da proteína pró-apoptótica Bax, bem como da diminuição da razão Bcl-2/Bax, no hipocampo de camundongos submetidos ao ECI. Ainda, também foi capaz de proteger do comportamento tipo-depressivo (aumento no tempo de imobilidade no TSC e no consumo de sacarose no TCS) induzido pelo protocolo CORT bem como impediu a diminuição nos níveis de BDNF no córtex pré-frontal de camundongos submetidos a este protocolo reforçando seu efeito tipo-antidepressivo associado a modulação nos níveis de BDNF bem como demonstrando pela primeira vez sua ação em modelos animais de depressão que mimetizam a situação clínica da doença.

Ainda, a administração repetida de AU (0,1 mg/kg p.o., 7 dias) protegeu do comportamento tipo-ansioso induzido pelo CORT (diminuição no tempo de permanência no centro do aparato). Este possível efeito tipo-ansiolítico foi confirmado agudamente no TCA e no LCE, nos quais a administração de AU (10 mg/kg, p.o.) produziu efeito tipo-ansiolítico.

6. PERSPECTIVAS

- Realizar a dosagem de neurotransmissores (5-HT, NE e DA) e seus metabólitos no hipocampo e córtex cerebral de animais submetidos ao tratamento agudo e/ou repetido com AU.

- Verificar os níveis e atividade de caspase-3 no hipocampo, de animais submetidos ao protocolo do ECI e tratados com AU.

- Verificar os níveis de BDNF no hipocampo e estriado de animais submetidos ao tratamento repetido com AU e ao protocolo CORT.

REFERÊNCIAS

- AGGARWAL, B. B.; TAKADA, Y.; OOMMEN, O. V. From chemoprevention to chemotherapy: common targets and common goals. **Expert Opin Investig Drugs**, v. 13, n. 10, p. 1327-38, 2004.
- AGO, Y. *et al.* . Antidepressant-like effects of the glucocorticoid receptor antagonist RU-43044 are associated with changes in prefrontal dopamine in mouse models of depression. **Neuropharmacology**, v. 55, n. 8, p. 1355-63, 2008.
- AGO, Y. *et al.* . Metabotropic glutamate 2/3 receptor antagonists improve behavioral and prefrontal dopaminergic alterations in the chronic corticosterone-induced depression model in mice. **Neuropharmacology**, v. 65, p. 29-38, 2013.
- ALBELDA, N.; JOEL, D. Animal models of obsessive-compulsive disorder: exploring pharmacology and neural substrates. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 36, n. 1, p. 47-63, 2012.
- ALVARADO, H. L. *et al.* . Design and optimization of oleanolic/ursolic acid-loaded nanoplateforms for ocular anti-inflammatory applications. **Nanomedicine**, 2015.
- ANDRADE, C. Augmentation of venlafaxine with bupropion: risks associated with a triple monoamine reuptake inhibition approach to partially responsive depression. **J Clin Psychiatry**, v. 74, n. 2, p. e119-21, 2013.
- ANISMAN, H.; MATHESON, K. Stress, depression, and anhedonia: caveats concerning animal models. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 29, n. 4-5, p. 525-46, 2005.
- ASCHBACHER, K. *et al.* . Maintenance of a positive outlook during acute stress protects against pro-inflammatory reactivity and future depressive symptoms. **Brain Behav Immun**, v. 26, n. 2, p. 346-52, 2012.
- AUTRY, A. E. *et al.* . Gender-specific impact of brain-derived neurotrophic factor signaling on stress-induced depression-like behavior. **Biol Psychiatry**, v. 66, n. 1, p. 84-90, 2009.

BAAMONDE, A. *et al.* . Antidepressant-type effects of endogenous enkephalins protected by systemic RB 101 are mediated by opioid delta and dopamine D1 receptor stimulation. **Eur J Pharmacol**, v. 216, n. 2, p. 157-66, 1992.

BABALOLA, I. T.; SHODE, F. O. Ubiquitous Ursolic Acid: A Potential Pentacyclic Triterpene Natural Product. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 2, p. 214-222, 2013.

BAKISH, D. The patient with comorbid depression and anxiety: the unmet need. **J Clin Psychiatry**, v. 60 Suppl 6, p. 20-4, 1999.

BALDWIN, D. S.; WALDMAN, S.; ALLGULANDER, C. Evidence-based pharmacological treatment of generalized anxiety disorder. **Int J Neuropsychopharmacol**, v. 14, n. 5, p. 697-710, 2011.

BANERJEE, R. *et al.* . Decreased mRNA and Protein Expression of BDNF, NGF, and their Receptors in the Hippocampus from Suicide: An Analysis in Human Postmortem Brain. **Clin Med Insights Pathol**, v. 6, p. 1-11, 2013.

BANG, H. S. *et al.* . Ursolic Acid-induced elevation of serum irisin augments muscle strength during resistance training in men. **Korean J Physiol Pharmacol**, v. 18, n. 5, p. 441-6, 2014.

BARNUM, C. J. *et al.* . Psychological stress in adolescent and adult mice increases neuroinflammation and attenuates the response to LPS challenge. **J Neuroinflammation**, v. 9, p. 9, 2012.

BENTLEY, S. M.; PAGALILAUAN, G. L.; SIMPSON, S. A. Major Depression. **Med Clin North Am**, v. 98, n. 5, p. 981-1005, 2014.

BERROCOSO, E. *et al.* . Active behaviours produced by antidepressants and opioids in the mouse tail suspension test. **Int J Neuropsychopharmacol**, v. 16, n. 1, p. 151-62, 2013.

BERROCOSO, E.; ROJAS-CORRALES, M. O.; MICO, J. A. Non-selective opioid receptor antagonism of the antidepressant-like effect of venlafaxine in the forced swimming test in mice. **Neurosci Lett**, v. 363, n. 1, p. 25-8, 2004.

BERTÉ, T. E. Estudo da Atividade Anticolinesterásica dos Compostos Taraxerol e Ácido Ursólico: Implicações Sobre o Processo de Memória. **Universidade do Vale Do Itajaí**, v. Dissertação, 2009.

BERTON, O.; NESTLER, E. J. New approaches to antidepressant drug discovery: beyond monoamines. **Nat Rev Neurosci**, v. 7, n. 2, p. 137-51, 2006.

BETTIO, L. E. *et al.* . Guanosine produces an antidepressant-like effect through the modulation of NMDA receptors, nitric oxide-cGMP and PI3K/mTOR pathways. **Behav Brain Res**, v. 234, n. 2, p. 137-48, 2012.

BHATIA, N. *et al.* . Adaptogenic potential of curcumin in experimental chronic stress and chronic unpredictable stress-induced memory deficits and alterations in functional homeostasis. **J Nat Med**, v. 65, n. 3-4, p. 532-43, 2011.

BIAN, Y. *et al.* . Learning, memory, and glial cell changes following recovery from chronic unpredictable stress. **Brain Res Bull**, v. 88, n. 5, p. 471-6, 2012.

BISAZ, R.; SANDI, C. The role of NCAM in auditory fear conditioning and its modulation by stress: a focus on the amygdala. **Genes Brain Behav**, v. 9, n. 4, p. 353-64, 2010.

BISAZ, R.; SCHACHNER, M.; SANDI, C. Causal evidence for the involvement of the neural cell adhesion molecule, NCAM, in chronic stress-induced cognitive impairments. **Hippocampus**, v. 21, n. 1, p. 56-71, 2011.

BLIER, P. Crosstalk between the norepinephrine and serotonin systems and its role in the antidepressant response. **J Psychiatry Neurosci**, v. 26 Suppl, p. S3-10, 2001.

BODKIN, J. A. *et al.* . Buprenorphine treatment of refractory depression. **J Clin Psychopharmacol**, v. 15, n. 1, p. 49-57, 1995.

BONDI, C. O. *et al.* . Chronic unpredictable stress induces a cognitive deficit and anxiety-like behavior in rats that is prevented by chronic

antidepressant drug treatment. **Neuropsychopharmacology**, v. 33, n. 2, p. 320-31, 2008.

BOURIN, M. *et al.* . A proposal of decision tree to screen putative antidepressants using forced swim and tail suspension tests. **Behav Brain Res**, v. 164, n. 2, p. 266-9, 2005.

BOURIN, M.; HASCOET, M. The mouse light/dark box test. **Eur J Pharmacol**, v. 463, n. 1-3, p. 55-65, 2003.

BRANCHI, I. *et al.* . Antidepressant treatment outcome depends on the quality of the living environment: a pre-clinical investigation in mice. **PLoS One**, v. 8, n. 4, p. e62226, 2013.

BREMNER, J. D. Structural changes in the brain in depression and relationship to symptom recurrence. **CNS Spectr**, v. 7, n. 2, p. 129-30, 135-9, 2002.

BROCARDO, P. S. *et al.* . Evidence for the involvement of the opioid system in the antidepressant-like effect of folic acid in the mouse forced swimming test. **Behav Brain Res**, v. 200, n. 1, p. 122-7, 2009.

BROWN, G. W.; HARRIS, T. Social origins of depression: a reply. **Psychol Med**, v. 8, n. 4, p. 577-88, 1978.

BROWN, T. A. *et al.* . Current and lifetime comorbidity of the DSM-IV anxiety and mood disorders in a large clinical sample. **J Abnorm Psychol**, v. 110, n. 4, p. 585-99, 2001.

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

BULLOCH, A. *et al.* . Recurrence of Major Depressive Episodes Is Strongly Dependent on the Number of Previous Episodes. **Depress Anxiety**, 2013.

CAMPBELL, S. *et al.* . Lower hippocampal volume in patients suffering from depression: a meta-analysis. **Am J Psychiatry**, v. 161, n. 4, p. 598-607, 2004.

- CAMPOS, A. C. *et al.* . Animal models of anxiety disorders and stress. **Rev Bras Psiquiatr**, v. 35 Suppl 2, p. S101-11, 2013a.
- CAMPOS, A. C. *et al.* . The anxiolytic effect of cannabidiol on chronically stressed mice depends on hippocampal neurogenesis: involvement of the endocannabinoid system. **Int J Neuropsychopharmacol**, v. 16, n. 6, p. 1407-19, 2013b.
- CASSANO, P.; FAVA, M. Depression and public health: an overview. **J Psychosom Res**, v. 53, n. 4, p. 849-57, 2002.
- CASTREN, E. Neurotrophic effects of antidepressant drugs. **Curr Opin Pharmacol**, v. 4, n. 1, p. 58-64, 2004.
- CHATTERJEE, M. *et al.* . Evaluation of ethanol leaf extract of *Ocimum sanctum* in experimental models of anxiety and depression. **Pharm Biol**, v. 49, n. 5, p. 477-83, 2011.
- CHATTOPADHYAY, D. *et al.* . CNS activity of the methanol extract of *Mallotus peltatus* (Geist) Muell Arg. leaf: an ethnomedicine of Onge. **J Ethnopharmacol**, v. 85, n. 1, p. 99-105, 2003.
- CHEN, B. *et al.* . Increased hippocampal BDNF immunoreactivity in subjects treated with antidepressant medication. **Biol Psychiatry**, v. 50, n. 4, p. 260-5, 2001.
- CHEN, Q. *et al.* . Development of a liquid chromatography-mass spectrometry method for the determination of ursolic acid in rat plasma and tissue: application to the pharmacokinetic and tissue distribution study. **Anal Bioanal Chem**, v. 399, n. 8, p. 2877-84, 2011.
- CHEN, Y. *et al.* . Behavioral and biochemical studies of total furocoumarins from seeds of *Psoralea corylifolia* in the chronic mild stress model of depression in mice. **Phytomedicine**, v. 14, n. 7-8, p. 523-9, 2007.
- CHOLERIS, E. *et al.* . A detailed ethological analysis of the mouse open field test: effects of diazepam, chlordiazepoxide and an extremely low frequency pulsed magnetic field. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 25, n. 3, p. 235-60, 2001.

CHUNG, Y. K. *et al.* . Inhibitory effect of ursolic acid purified from *Origanum majorana* L on the acetylcholinesterase. **Mol Cells**, v. 11, n. 2, p. 137-43, 2001.

COLLA, A. R. *et al.* . Involvement of monoaminergic systems in the antidepressant-like effect of *Eugenia brasiliensis* Lam. (Myrtaceae) in the tail suspension test in mice. **J Ethnopharmacol**, v. 143, n. 2, p. 720-31, 2012.

COMBS, H.; MARKMAN, J. Anxiety Disorders in Primary Care. **Med Clin North Am**, v. 98, n. 5, p. 1007-1023, 2014.

CORY, S.; ADAMS, J. M. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. **Nat Rev Cancer**, v. 2, n. 9, p. 647-56, 2002.

COSTALL, B. *et al.* . Exploration of mice in a black and white test box: validation as a model of anxiety. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 32, n. 3, p. 777-85, 1989.

COTTER, D. *et al.* . Reduced neuronal size and glial cell density in area 9 of the dorsolateral prefrontal cortex in subjects with major depressive disorder. **Cereb Cortex**, v. 12, n. 4, p. 386-94, 2002.

COUTINHO-NETTO, J.; ABDUL-GHANI, A. S.; BRADFORD, H. F. Suppression of evoked and spontaneous release of neurotransmitters in vivo by morphine. **Biochem Pharmacol**, v. 29, n. 20, p. 2777-80, 1980.

CRUPI, R. *et al.* . Hypericum perforatum treatment: effect on behaviour and neurogenesis in a chronic stress model in mice. **BMC Complement Altern Med**, v. 11, p. 7, 2011.

CRUPI, R. *et al.* . Effects of palmitoylethanolamide and luteolin in an animal model of anxiety/depression. **CNS Neurol Disord Drug Targets**, v. 12, n. 7, p. 989-1001, 2013.

CRYAN, J. F. *et al.* . Use of dopamine-beta-hydroxylase-deficient mice to determine the role of norepinephrine in the mechanism of action of antidepressant drugs. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 298, n. 2, p. 651-7, 2001.

CRYAN, J. F.; MARKOU, A.; LUCKI, I. Assessing antidepressant activity in rodents: recent developments and future needs. **Trends Pharmacol Sci**, v. 23, n. 5, p. 238-45, 2002.

CRYAN, J. F.; MOMBÉREAU, C.; VASSOUT, A. The tail suspension test as a model for assessing antidepressant activity: review of pharmacological and genetic studies in mice. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 29, n. 4-5, p. 571-625, 2005.

CUIJPERS, P.; SMIT, F. Excess mortality in depression: a meta-analysis of community studies. **J Affect Disord**, v. 72, n. 3, p. 227-36, 2002.

CUMMINGS, J. L. The neuroanatomy of depression. **J Clin Psychiatry**, v. 54 Suppl, p. 14-20, 1993.

CUNHA, M. P. *et al.* . Interaction of zinc with antidepressants in the tail suspension test. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 32, n. 8, p. 1913-20, 2008.

CUNHA, M. P. *et al.* . The activation of alpha1-adrenoceptors is implicated in the antidepressant-like effect of creatine in the tail suspension test. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 44, p. 39-50, 2013.

D'AQUILA, P. S. *et al.* . The role of dopamine in the mechanism of action of antidepressant drugs. **Eur J Pharmacol**, v. 405, n. 1-3, p. 365-73, 2000.

DAILLY, E. *et al.* . Dopamine, depression and antidepressants. **Fundam Clin Pharmacol**, v. 18, n. 6, p. 601-7, 2004.

DARCET, F. *et al.* . Learning and memory impairments in a neuroendocrine mouse model of anxiety/depression. **Front Behav Neurosci**, v. 8, p. 136, 2014.

DARKO, D. F. *et al.* . Association of beta-endorphin with specific clinical symptoms of depression. **Am J Psychiatry**, v. 149, n. 9, p. 1162-7, 1992.

DAVID, D. J. *et al.* . Neurogenesis-dependent and -independent effects of fluoxetine in an animal model of anxiety/depression. **Neuron**, v. 62, n. 4, p. 479-93, 2009.

DE ANGELIS, L.; FURLAN, C. The anxiolytic-like properties of two selective MAOIs, moclobemide and selegiline, in a standard and an enhanced light/dark aversion test. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 65, n. 4, p. 649-53, 2000.

DE FELIPE, M. C. *et al.* . Antidepressant action of imipramine and iprindole in mice is enhanced by inhibitors of enkephalin-degrading peptidases. **Eur J Pharmacol**, v. 159, n. 2, p. 175-80, 1989.

DELL'OSSO, B. *et al.* . The noradrenergic action in antidepressant treatments: pharmacological and clinical aspects. **CNS Neurosci Ther**, v. 17, n. 6, p. 723-32, 2011.

DER-AVAKIAN, A.; MARKOU, A. The neurobiology of anhedonia and other reward-related deficits. **Trends Neurosci**, v. 35, n. 1, p. 68-77, 2012.

DI GIANNANTONIO, M.; MARTINOTTI, G. Anhedonia and major depression: the role of agomelatine. **Eur Neuropsychopharmacol**, v. 22 Suppl 3, p. S505-10, 2012.

DIAZGRANADOS, N. *et al.* . Rapid resolution of suicidal ideation after a single infusion of an N-methyl-D-aspartate antagonist in patients with treatment-resistant major depressive disorder. **J Clin Psychiatry**, v. 71, n. 12, p. 1605-11, 2010.

DING, L. *et al.* . Protective effects of phosphodiesterase 2 inhibitor on depression- and anxiety-like behaviors: involvement of antioxidant and anti-apoptotic mechanisms. **Behav Brain Res**, v. 268, p. 150-8, 2014.

DIZ-CHAVES, Y. *et al.* . Behavioral effects of estradiol therapy in ovariectomized rats depend on the age when the treatment is initiated. **Exp Gerontol**, v. 47, n. 1, p. 93-9, 2012.

DSM-V. **Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders 5th Ed.** American Psychiatric Publishing, 2013.

DUMAN, R. S. Neural plasticity: consequences of stress and actions of antidepressant treatment. **Dialogues Clin Neurosci**, v. 6, n. 2, p. 157-69, 2004.

DZIEDZICKA-WASYLEWSKA, M. *et al.* . Effect of antidepressant drugs in mice lacking the norepinephrine transporter. **Neuropsychopharmacology**, v. 31, n. 11, p. 2424-32, 2006.

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

ELHWUEGI, A. S. Central monoamines and their role in major depression. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 28, n. 3, p. 435-51, 2004.

EMAMGHOREISHI, M.; TALEBIANPOUR, M. S. Antidepressant effect of *Melissa officinalis* in the forced swimming test. **Daru-Journal of Faculty of Pharmacy**, v. 17, n. 1, p. 42-47, 2009.

ENGEL, D. F. Estudo do Efeito Neuroprotetor da Duloxetina. **Universidade Federal de Santa Catarina**, v. Dissertação, 2013.

ENGSTROM, G. *et al.* . Reduced cerebrospinal HVA concentrations and HVA/5-HIAA ratios in suicide attempters. Monoamine metabolites in 120 suicide attempters and 47 controls. **Eur Neuropsychopharmacol**, v. 9, n. 5, p. 399-405, 1999.

ENNACEUR, A. Tests of unconditioned anxiety - Pitfalls and disappointments. **Physiol Behav**, v. 135C, p. 55-71, 2014.

FARADAY, M. M. Rat sex and strain differences in responses to stress. **Physiol Behav**, v. 75, n. 4, p. 507-22, 2002.

FARIA, R. *et al.* . Alterations in phospholipidomic profile in the brain of mouse model of depression induced by chronic unpredictable stress. **Neuroscience**, v. 273, p. 1-11, 2014.

FASSBENDER, K. *et al.* . Mood disorders and dysfunction of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in multiple sclerosis: association with cerebral inflammation. **Arch Neurol**, v. 55, n. 1, p. 66-72, 1998.

FAVA, M. *et al.* . Anxiety disorders in major depression. **Compr Psychiatry**, v. 41, n. 2, p. 97-102, 2000.

FILE, S. E. Recent developments in anxiety, stress, and depression. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 54, n. 1, p. 3-12, 1996.

FINEBERG, N. A. *et al.* . Translational approaches to obsessive-compulsive disorder: from animal models to clinical treatment. **Br J Pharmacol**, v. 164, n. 4, p. 1044-61, 2011.

FREITAS, A. E. Agmatina, Um Candidato à Adjuvante da Farmacoterapia da Depressão: Estudos in vitro e in vivo. **Universidade Federal de Santa Catarina**, v. Tese, 2014.

FREITAS, A. E. *et al.* . Fluoxetine modulates hippocampal cell signaling pathways implicated in neuroplasticity in olfactory bulbectomized mice. **Behav Brain Res**, v. 237, p. 176-84, 2013a.

FREITAS, A. E. *et al.* . Antidepressant-like action of the bark ethanolic extract from *Tabebuia avellanedae* in the olfactory bulbectomized mice. **J Ethnopharmacol**, v. 145, n. 3, p. 737-45, 2013b.

GARCIA, L. S. *et al.* . Ketamine treatment reverses behavioral and physiological alterations induced by chronic mild stress in rats. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 33, n. 3, p. 450-5, 2009.

GAVIOLI, E. C. *et al.* . Altered anxiety-related behavior in nociceptin/orphanin FQ receptor gene knockout mice. **Peptides**, v. 28, n. 6, p. 1229-39, 2007.

GILLESPIE, C. F.; NEMEROFF, C. B. Hypercortisolemia and depression. **Psychosom Med**, v. 67 Suppl 1, p. S26-8, 2005.

GOLD, P. W.; CHROUSOS, G. P. Organization of the stress system and its dysregulation in melancholic and atypical depression: high vs low CRH/NE states. **Mol Psychiatry**, v. 7, n. 3, p. 254-75, 2002.

GOLD, P. W. *et al.* . Corticotropin releasing hormone in the pathophysiology of melancholic and atypical depression and in the

mechanism of action of antidepressant drugs. **Ann N Y Acad Sci**, v. 771, p. 716-29, 1995.

GONCALVES, A. E. *et al.* . The antidepressant-like effect of *Hedyosmum brasiliense* and its sesquiterpene lactone, podoandin in mice: evidence for the involvement of adrenergic, dopaminergic and serotonergic systems. **Eur J Pharmacol**, v. 674, n. 2-3, p. 307-14, 2012.

GOURLEY, S. L. *et al.* . Antidepressant-like properties of oral riluzole and utility of incentive disengagement models of depression in mice. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 219, n. 3, p. 805-14, 2012.

GOURLEY, S. L.; TAYLOR, J. R. Recapitulation and reversal of a persistent depression-like syndrome in rodents. **Curr Protoc Neurosci**, v. Chapter 9, p. Unit 9 32, 2009.

GRASSI, D. *et al.* . Chronic unpredictable stress and long-term ovariectomy affect arginine-vasopressin expression in the paraventricular nucleus of adult female mice. **Brain Res**, 2014.

GRAYBIEL, A. M.; SAKA, E. A genetic basis for obsessive grooming. **Neuron**, v. 33, n. 1, p. 1-2, 2002.

GREENBERG, P. E. *et al.* . The economic burden of depression in the United States: how did it change between 1990 and 2000? **J Clin Psychiatry**, v. 64, n. 12, p. 1465-75, 2003.

GUPTA, D.; RADHAKRISHNAN, M.; KURHE, Y. 5HT₃ receptor antagonist (ondansetron) reverses depressive behavior evoked by chronic unpredictable stress in mice: modulation of hypothalamic-pituitary-adrenocortical and brain serotonergic system. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 124, p. 129-36, 2014.

HACHE, G. *et al.* . Antinociceptive effects of fluoxetine in a mouse model of anxiety/depression. **Neuroreport**, v. 23, n. 9, p. 525-9, 2012.

HAMMACK, S. E. *et al.* . Chronic stress increases pituitary adenylyl cyclase-activating peptide (PACAP) and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) mRNA expression in the bed nucleus of the stria terminalis (BNST): roles for PACAP in anxiety-like behavior. **Psychoneuroendocrinology**, v. 34, n. 6, p. 833-43, 2009.

HAMMEN, C. Stress and depression. **Annu Rev Clin Psychol**, v. 1, p. 293-319, 2005.

HAMON, M.; BLIER, P. Monoamine neurocircuitry in depression and strategies for new treatments. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 45C, p. 54-63, 2013.

HASAN, S. *et al.* . Multivitamin-mineral and vitamins (E + C) supplementation modulate chronic unpredictable stress-induced oxidative damage in brain and heart of mice. **Biol Trace Elem Res**, v. 142, n. 3, p. 589-97, 2011.

HASAN, S. *et al.* . Effect of chronic unpredictable stress on short term dietary restriction and its modulation by multivitamin-mineral supplementation. **Appetite**, v. 65, p. 68-74, 2013.

HECHT, H.; VON ZERSSSEN, D.; WITTCHEN, H. U. Anxiety and depression in a community sample: the influence of comorbidity on social functioning. **J Affect Disord**, v. 18, n. 2, p. 137-44, 1990.

HEO, H. J. *et al.* . Ursolic acid of *Origanum majorana* L. reduces Abeta-induced oxidative injury. **Mol Cells**, v. 13, n. 1, p. 5-11, 2002.

HETTEMA, J. M. What is the genetic relationship between anxiety and depression? **Am J Med Genet C Semin Med Genet**, v. 148C, n. 2, p. 140-6, 2008.

HICKIE, I. *et al.* . Reduced hippocampal volumes and memory loss in patients with early- and late-onset depression. **Br J Psychiatry**, v. 186, p. 197-202, 2005.

HILL, M. P.; BROTHIE, J. M. Modulation of glutamate release by a kappa-opioid receptor agonist in rodent and primate striatum. **Eur J Pharmacol**, v. 281, n. 1, p. R1-R2, 1995.

HOGG, S. A review of the validity and variability of the elevated plus-maze as an animal model of anxiety. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 54, n. 1, p. 21-30, 1996.

HOLSBOER, F. The rationale for corticotropin-releasing hormone receptor (CRH-R) antagonists to treat depression and anxiety. **J Psychiatr Res**, v. 33, n. 3, p. 181-214, 1999.

HOLSBOER, F.; ISING, M. Central CRH system in depression and anxiety--evidence from clinical studies with CRH1 receptor antagonists. **Eur J Pharmacol**, v. 583, n. 2-3, p. 350-7, 2008.

HONG, S. Y.; JEONG, W. S.; JUN, M. Protective effects of the key compounds isolated from Corni fructus against beta-amyloid-induced neurotoxicity in PC12 cells. **Molecules**, v. 17, n. 9, p. 10831-45, 2012.

HORESH, N.; KLOMEK, A. B.; APTER, A. Stressful life events and major depressive disorders. **Psychiatry Res**, v. 160, n. 2, p. 192-9, 2008.

HOWELL, K. R.; KUTIYANAWALLA, A.; PILLAI, A. Long-term continuous corticosterone treatment decreases VEGF receptor-2 expression in frontal cortex. **PLoS One**, v. 6, n. 5, p. e20198, 2011.

HUANG, Z. *et al.* . Mechanistic study on the antidepressant-like effect of danggui-shaoyao-san, a chinese herbal formula. **Evid Based Complement Alternat Med**, v. 2012, p. 173565, 2012.

HUANG, Z. *et al.* . Curcumin reverses corticosterone-induced depressive-like behavior and decrease in brain BDNF levels in rats. **Neurosci Lett**, v. 493, n. 3, p. 145-8, 2011.

HUETHER, G. *et al.* . The stress-reaction process and the adaptive modification and reorganization of neuronal networks. **Psychiatry Res**, v. 87, n. 1, p. 83-95, 1999.

HUNTER, R. M. *et al.* . Modelling the cost-effectiveness of preventing major depression in general practice patients. **Psychol Med**, p. 1-10, 2013.

HWANG, K. H. Monoamine oxidase inhibitory activities of Korean medicinal plants classified to cold drugs by the theory of KIMI. **Food Sci Biotechnol**, v. 12, n. 3, p. 238-241, 2003.

HWANG, K. H.; PARK, H. J. Inhibitory activity of the fruit extract of *Gardenia jasminoides* on monoamine oxidase. ***Korean Journal of Pharmacognosy***, v. 38, p. 108-112, 2007.

IMAIZUMI, M.; MIYAZAKI, S.; ONODERA, K. Effects of xanthine derivatives in a light/dark test in mice and the contribution of adenosine receptors. ***Methods Find Exp Clin Pharmacol***, v. 16, n. 9, p. 639-44, 1994.

INOUE, T.; KOYAMA, T. Effects of acute and chronic administration of high-dose corticosterone and dexamethasone on regional brain dopamine and serotonin metabolism in rats. ***Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry***, v. 20, n. 1, p. 147-56, 1996.

ISINGRINI, E. *et al.* . Association between repeated unpredictable chronic mild stress (UCMS) procedures with a high fat diet: a model of fluoxetine resistance in mice. ***PLoS One***, v. 5, n. 4, p. e10404, 2010.

JANG, S. M. *et al.* . Ursolic acid enhances the cellular immune system and pancreatic beta-cell function in streptozotocin-induced diabetic mice fed a high-fat diet. ***Int Immunopharmacol***, v. 9, n. 1, p. 113-9, 2009.

JINDAL, A.; MAHESH, R.; BHATT, S. Etazolol rescues behavioral deficits in chronic unpredictable mild stress model: Modulation of hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity and brain-derived neurotrophic factor level. ***Neurochem Int***, v. 63, n. 5, p. 465-475, 2013.

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, A. V.; WHEATON, M.; MURPHY, D. L. What's wrong with my mouse model? Advances and strategies in animal modeling of anxiety and depression. ***Behav Brain Res***, v. 179, n. 1, p. 1-18, 2007.

KASTER, M. P. *et al.* . Pharmacological evidence for the involvement of the opioid system in the antidepressant-like effect of adenosine in the mouse forced swimming test. ***Eur J Pharmacol***, v. 576, n. 1-3, p. 91-8, 2007.

KEDIA, S.; CHATTARJI, S. Marble burying as a test of the delayed anxiogenic effects of acute immobilisation stress in mice. **J Neurosci Methods**, v. 233, p. 150-4, 2014.

KELLER, M. B. *et al.* . Optimizing outcomes in depression: focus on antidepressant compliance. **Int Clin Psychopharmacol**, v. 17, n. 6, p. 265-71, 2002.

KESSLER, R. C. *et al.* . Prevalence, severity, and comorbidity of 12-month DSM-IV disorders in the National Comorbidity Survey Replication. **Arch Gen Psychiatry**, v. 62, n. 6, p. 617-27, 2005.

KHAN, A. *et al.* . Suicide risk in patients with anxiety disorders: a meta-analysis of the FDA database. **J Affect Disord**, v. 68, n. 2-3, p. 183-90, 2002.

KIM, J. H.; KIM, G. H.; HWANG, K. H. Monoamine Oxidase and Dopamine beta-Hydroxylase Inhibitors from the Fruits of *Gardenia jasminoides*. **Biomol Ther (Seoul)**, v. 20, n. 2, p. 214-9, 2012.

KITA, A. *et al.* . Antinociceptive and antidepressant-like profiles of BL-2401, a novel enkephalinase inhibitor, in mice and rats. **Jpn J Pharmacol**, v. 75, n. 4, p. 337-46, 1997.

KLIETHERMES, C. L. Anxiety-like behaviors following chronic ethanol exposure. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 28, n. 8, p. 837-50, 2005.

KOE, B. K.; WEISSMAN, A. p-Chlorophenylalanine: a specific depletor of brain serotonin. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 154, n. 3, p. 499-516, 1966.

KOIKE, H.; IJIMA, M.; CHAKI, S. Effects of ketamine and LY341495 on the depressive-like behavior of repeated corticosterone-injected rats. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 107, p. 20-3, 2013.

KOSTEN, T. A. *et al.* . Repeated unpredictable stress and antidepressants differentially regulate expression of the bcl-2 family of apoptotic genes in rat cortical, hippocampal, and limbic brain structures. **Neuropsychopharmacology**, v. 33, n. 7, p. 1545-58, 2008.

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

KRYSTAL, J. H.; SANACORA, G.; DUMAN, R. S. Rapid-acting glutamatergic antidepressants: the path to ketamine and beyond. **Biol Psychiatry**, v. 73, n. 12, p. 1133-41, 2013.

KUHLMANN, S. R.; WALTER, H.; SCHLAPFER, T. E. [The neurobiology of anhedonia. The pathophysiology of an important symptom in depressive disorders]. **Nervenarzt**, v. 84, n. 5, p. 590-5, 2013.

KUMAR, B. *et al.* . Vaccinium myrtillus ameliorates unpredictable chronic mild stress induced depression: possible involvement of nitric oxide pathway. **Phytother Res**, v. 26, n. 4, p. 488-97, 2012.

KUMAR, B.; KUHAD, A.; CHOPRA, K. Neuropsychopharmacological effect of sesamol in unpredictable chronic mild stress model of depression: behavioral and biochemical evidences. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 214, n. 4, p. 819-28, 2011.

KUTIYANAWALLA, A.; TERRY, A. V., JR.; PILLAI, A. Cysteamine attenuates the decreases in TrkB protein levels and the anxiety/depression-like behaviors in mice induced by corticosterone treatment. **PLoS One**, v. 6, n. 10, p. e26153, 2011.

LAGUNAS, N. *et al.* . Long-term ovariectomy enhances anxiety and depressive-like behaviors in mice submitted to chronic unpredictable stress. **Horm Behav**, v. 58, n. 5, p. 786-91, 2010.

LANG, U. E.; BORGWARDT, S. Molecular Mechanisms of Depression: Perspectives on New Treatment Strategies. **Cell Physiol Biochem**, v. 31, n. 6, p. 761-777, 2013.

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.

LARSEN, M. H. *et al.* . Regulation of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in the chronic unpredictable stress rat model and the effects of

chronic antidepressant treatment. **J Psychiatr Res**, v. 44, n. 13, p. 808-16, 2010.

LAURSEN, S. E.; BELKNAP, J. K. Intracerebroventricular injections in mice. Some methodological refinements. **J Pharmacol Methods**, v. 16, n. 4, p. 355-7, 1986.

LAYER, R. T. *et al.* . Antidepressant-like actions of the polyamine site NMDA antagonist, eliprodil (SL-82.0715). **Pharmacol Biochem Behav**, v. 52, n. 3, p. 621-7, 1995.

LE DANTEC, Y. *et al.* . NREM sleep hypersomnia and reduced sleep/wake continuity in a neuroendocrine mouse model of anxiety/depression based on chronic corticosterone administration. **Neuroscience**, v. 274, p. 357-68, 2014.

LEE, J. *et al.* . Ursolic acid ameliorates thymic atrophy and hyperglycemia in streptozotocin-nicotinamide-induced diabetic mice. **Chem Biol Interact**, v. 188, n. 3, p. 635-42, 2010.

LEPINE, J. P.; BRILEY, M. The increasing burden of depression. **Neuropsychiatr Dis Treat**, v. 7, n. Suppl 1, p. 3-7, 2011.

LEVINSTEIN, M. R.; SAMUELS, B. A. Mechanisms underlying the antidepressant response and treatment resistance. **Front Behav Neurosci**, v. 8, p. 208, 2014.

LI, L. *et al.* . Ursolic acid promotes the neuroprotection by activating Nrf2 pathway after cerebral ischemia in mice. **Brain Res**, v. 1497, p. 32-9, 2013.

LI, N. *et al.* . Glutamate N-methyl-D-aspartate receptor antagonists rapidly reverse behavioral and synaptic deficits caused by chronic stress exposure. **Biol Psychiatry**, v. 69, n. 8, p. 754-61, 2011.

LI, S. *et al.* . Antidepressant like effects of piperine in chronic mild stress treated mice and its possible mechanisms. **Life Sci**, v. 80, n. 15, p. 1373-81, 2007.

LIANG, Y. *et al.* . Antidepressant-like pharmacological profile of a novel triple reuptake inhibitor, (1S,2S)-3-(methylamino)-2-(naphthalen-

2-yl)-1-phenylpropan-1-ol (PRC200-SS). **J Pharmacol Exp Ther**, v. 327, n. 2, p. 573-83, 2008.

LIAO, M. J. *et al.* . Daphnetin prevents chronic unpredictable stress-induced cognitive deficits. **Fundam Clin Pharmacol**, v. 27, n. 5, p. 510-6, 2013.

LICINIO, J.; WONG, M. L. Depression, antidepressants and suicidality: a critical appraisal. **Nat Rev Drug Discov**, v. 4, n. 2, p. 165-71, 2005.

LINDHOLM, J. S.; CASTREN, E. Mice with altered BDNF signaling as models for mood disorders and antidepressant effects. **Front Behav Neurosci**, v. 8, p. 143, 2014.

LINDSTEN, T.; ZONG, W. X.; THOMPSON, C. B. Defining the role of the Bcl-2 family of proteins in the nervous system. **Neuroscientist**, v. 11, n. 1, p. 10-5, 2005.

LIPTON, S. A.; ROSENBERG, P. A. Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders. **N Engl J Med**, v. 330, n. 9, p. 613-22, 1994.

LIU, J. Pharmacology of oleanolic acid and ursolic acid. **J Ethnopharmacol**, v. 49, n. 2, p. 57-68, 1995.

LOPEZ, V. *et al.* . Neuroprotective and neurological properties of *Melissa officinalis*. **Neurochem Res**, v. 34, n. 11, p. 1955-61, 2009.

LOWY, M. T.; WITTENBERG, L.; YAMAMOTO, B. K. Effect of acute stress on hippocampal glutamate levels and spectrin proteolysis in young and aged rats. **J Neurochem**, v. 65, n. 1, p. 268-74, 1995.

LU, J. *et al.* . Ursolic acid improves high fat diet-induced cognitive impairments by blocking endoplasmic reticulum stress and I κ B kinase beta/nuclear factor-kappaB-mediated inflammatory pathways in mice. **Brain Behav Immun**, v. 25, n. 8, p. 1658-67, 2011.

LU, J. *et al.* . Ursolic acid attenuates D-galactose-induced inflammatory response in mouse prefrontal cortex through inhibiting AGEs/RAGE/NF-kappaB pathway activation. **Cereb Cortex**, v. 20, n. 11, p. 2540-8, 2010.

LU, J. *et al.* . Ursolic acid ameliorates cognition deficits and attenuates oxidative damage in the brain of senescent mice induced by D-galactose. **Biochem Pharmacol**, v. 74, n. 7, p. 1078-90, 2007.

LU, X. Y. *et al.* . Leptin: a potential novel antidepressant. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 103, n. 5, p. 1593-8, 2006.

LUCASSEN, P. J.; FUCHS, E.; CZECH, B. Antidepressant treatment with tianeptine reduces apoptosis in the hippocampal dentate gyrus and temporal cortex. **Biol Psychiatry**, v. 55, n. 8, p. 789-96, 2004.

MACHADO-VIEIRA, R. *et al.* . Novel glutamatergic agents for major depressive disorder and bipolar disorder. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 100, n. 4, p. 678-87, 2012.

MACHADO, D. G. *et al.* . Antidepressant-like effect of the extract of *Rosmarinus officinalis* in mice: involvement of the monoaminergic system. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 33, n. 4, p. 642-50, 2009.

MACHADO, D. G. *et al.* . Antidepressant-like effect of rutin isolated from the ethanolic extract from *Schinus molle* L. in mice: evidence for the involvement of the serotonergic and noradrenergic systems. **Eur J Pharmacol**, v. 587, n. 1-3, p. 163-8, 2008.

MACHADO, D. G. *et al.* . Antidepressant-like effects of fractions, essential oil, carnosol and betulinic acid isolated from *Rosmarinus officinalis* L. **Food Chem**, v. 136, n. 2, p. 999-1005, 2013.

MACHADO, D. G. *et al.* . Fluoxetine reverses depressive-like behaviors and increases hippocampal acetylcholinesterase activity induced by olfactory bulbectomy. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 103, n. 2, p. 220-9, 2012a.

MACHADO, D. G. *et al.* . *Rosmarinus officinalis* L. hydroalcoholic extract, similar to fluoxetine, reverses depressive-like behavior without altering learning deficit in olfactory bulbectomized mice. **J Ethnopharmacol**, v. 143, n. 1, p. 158-69, 2012b.

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. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 103, n. 2, p. 204-11, 2012c.

MAITY, T. K. *et al.* . Effect of *Ocimum sanctum* roots extract on swimming performance in mice. **Phytother Res**, v. 14, n. 2, p. 120-1, 2000.

MANJI, H. K.; DUMAN, R. S. Impairments of neuroplasticity and cellular resilience in severe mood disorders: implications for the development of novel therapeutics. **Psychopharmacol Bull**, v. 35, n. 2, p. 5-49, 2001.

MANSOUR, A. *et al.* . Anatomy of CNS opioid receptors. **Trends Neurosci**, v. 11, n. 7, p. 308-14, 1988.

MAO, Q. Q. *et al.* . Peony glycosides reverse the effects of corticosterone on behavior and brain BDNF expression in rats. **Behav Brain Res**, v. 227, n. 1, p. 305-9, 2012.

MAO, Q. Q. *et al.* . Piperine reverses the effects of corticosterone on behavior and hippocampal BDNF expression in mice. **Neurochem Int**, v. 74, p. 36-41, 2014.

MAO, Q. Q. *et al.* . Effects of peony glycosides on mice exposed to chronic unpredictable stress: further evidence for antidepressant-like activity. **J Ethnopharmacol**, v. 124, n. 2, p. 316-20, 2009.

MASI, G.; BROVEDANI, P. The hippocampus, neurotrophic factors and depression: possible implications for the pharmacotherapy of depression. **CNS Drugs**, v. 25, n. 11, p. 913-31, 2011.

MATHERS, C. D.; LONCAR, D. Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. **PLoS Med**, v. 3, n. 11, p. e442, 2006.

MAURI, M. C. *et al.* . Plasma and platelet amino acid concentrations in patients affected by major depression and under fluvoxamine treatment. **Neuropsychobiology**, v. 37, n. 3, p. 124-9, 1998.

MAYORGA, A. J. *et al.* . Antidepressant-like behavioral effects in 5-hydroxytryptamine(1A) and 5-hydroxytryptamine(1B) receptor mutant mice. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 298, n. 3, p. 1101-7, 2001.

MAZE, M.; FUJINAGA, M. Recent advances in understanding the actions and toxicity of nitrous oxide. **Anaesthesia**, v. 55, n. 4, p. 311-4, 2000.

MCARTHUR, R.; BORSINI, F. Animal models of depression in drug discovery: a historical perspective. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 84, n. 3, p. 436-52, 2006.

MCKERNAN, D. P.; DINAN, T. G.; CRYAN, J. F. "Killing the Blues": a role for cellular suicide (apoptosis) in depression and the antidepressant response? **Prog Neurobiol**, v. 88, n. 4, p. 246-63, 2009.

MILLER, H. L. *et al.* . Effects of alpha-methyl-para-tyrosine (AMPT) in drug-free depressed patients. **Neuropsychopharmacology**, v. 14, n. 3, p. 151-7, 1996.

MITANI, H. *et al.* . Correlation between plasma levels of glutamate, alanine and serine with severity of depression. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 30, n. 6, p. 1155-8, 2006.

MORETTI, M. *et al.* . Ascorbic acid treatment, similarly to fluoxetine, reverses depressive-like behavior and brain oxidative damage induced by chronic unpredictable stress. **J Psychiatr Res**, v. 46, n. 3, p. 331-40, 2012.

MURCK, H. Ketamine, magnesium and major depression--from pharmacology to pathophysiology and back. **J Psychiatr Res**, v. 47, n. 7, p. 955-65, 2013.

MURRAY, C. J.; LOPEZ, A. D. Alternative projections of mortality and disability by cause 1990-2020: Global Burden of Disease Study. **Lancet**, v. 349, n. 9064, p. 1498-504, 1997.

MURRAY, F.; SMITH, D. W.; HUTSON, P. H. Chronic low dose corticosterone exposure decreased hippocampal cell proliferation, volume and induced anxiety and depression like behaviours in mice. **Eur J Pharmacol**, v. 583, n. 1, p. 115-27, 2008.

NASCA, C. *et al.* . L-acetylcarnitine causes rapid antidepressant effects through the epigenetic induction of mGlu2 receptors. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 110, n. 12, p. 4804-9, 2013.

NEMEROFF, C. B. Advancing the treatment of mood and anxiety disorders: the first 10 years' experience with paroxetine. **Psychopharmacol Bull**, v. 37 Suppl 1, p. 6-7, 2003.

_____. The burden of severe depression: a review of diagnostic challenges and treatment alternatives. **J Psychiatr Res**, v. 41, n. 3-4, p. 189-206, 2007.

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

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

NESTLER, E. J.; CARLEZON, W. A., JR. The mesolimbic dopamine reward circuit in depression. **Biol Psychiatry**, v. 59, n. 12, p. 1151-9, 2006.

NICIU, M. J.; KELMENDI, B.; SANACORA, G. Overview of glutamatergic neurotransmission in the nervous system. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 100, n. 4, p. 656-64, 2012.

NOSCHANG, C. G. *et al.* . Sex-specific differences on caffeine consumption and chronic stress-induced anxiety-like behavior and DNA breaks in the hippocampus. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 94, n. 1, p. 63-9, 2009.

NOVOTNY, L.; VACHALKOVA, A.; BIGGS, D. Ursolic acid: an anti-tumorigenic and chemopreventive activity. Minireview. **Neoplasma**, v. 48, n. 4, p. 241-6, 2001.

O'LEARY, O. F. *et al.* . Depletion of serotonin and catecholamines block the acute behavioral response to different classes of antidepressant drugs in the mouse tail suspension test. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 192, n. 3, p. 357-71, 2007.

OF, O. L.; DINAN, T. G.; CRYAN, J. F. Faster, better, stronger: Towards new antidepressant therapeutic strategies. **Eur J Pharmacol**, 2014.

OLAUSSON, P. *et al.* . Persistent effects of prior chronic exposure to corticosterone on reward-related learning and motivation in rodents. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 225, n. 3, p. 569-77, 2013.

ONGUR, D.; DREVETS, W. C.; PRICE, J. L. Glial reduction in the subgenual prefrontal cortex in mood disorders. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 95, n. 22, p. 13290-5, 1998.

OQUENDO, M. A. *et al.* . Lower cortisol levels in depressed patients with comorbid post-traumatic stress disorder. **Neuropsychopharmacology**, v. 28, n. 3, p. 591-8, 2003.

OTA, K. T. *et al.* . REDD1 is essential for stress-induced synaptic loss and depressive behavior. **Nat Med**, v. 20, n. 5, p. 531-5, 2014.

PALAZIDOU, E. The neurobiology of depression. **Br Med Bull**, v. 101, p. 127-45, 2012.

PAPAKOSTAS, G. I. Dopaminergic-based pharmacotherapies for depression. **Eur Neuropsychopharmacol**, v. 16, n. 6, p. 391-402, 2006.

PAPIOL, S. *et al.* . Genetic variability at HPA axis in major depression and clinical response to antidepressant treatment. **J Affect Disord**, v. 104, n. 1-3, p. 83-90, 2007.

PARADISE, M. B. *et al.* . The role of glia in late-life depression. **Int Psychogeriatr**, v. 24, n. 12, p. 1878-90, 2012.

PATTERSON, Z. R. *et al.* . Altered metabolic and neurochemical responses to chronic unpredictable stressors in ghrelin receptor-deficient mice. **Eur J Neurosci**, v. 32, n. 4, p. 632-9, 2010.

PETERSON, G. L. Determination of total protein. **Methods Enzymol**, v. 91, p. 95-119, 1983.

PICKAR, D. *et al.* . Plasma opioid activity in manic-depressive illness. **Lancet**, v. 1, n. 8174, p. 937, 1980.

PITMAN, D. L.; OTTENWELLER, J. E.; NATELSON, B. H. Effect of stressor intensity on habituation and sensitization of glucocorticoid responses in rats. **Behav Neurosci**, v. 104, n. 1, p. 28-36, 1990.

PITTENGER, C.; DUMAN, R. S. Stress, depression, and neuroplasticity: a convergence of mechanisms. **Neuropsychopharmacology**, v. 33, n. 1, p. 88-109, 2008.

POLLACK, M. H. Comorbid anxiety and depression. **J Clin Psychiatry**, v. 66 Suppl 8, p. 22-9, 2005.

PORSOLT, R. D.; BERTIN, A.; JALFRE, M. Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. **Arch Int Pharmacodyn Ther**, v. 229, n. 2, p. 327-36, 1977.

PORSOLT, R. D.; LE PICHON, M.; JALFRE, M. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. **Nature**, v. 266, n. 5604, p. 730-2, 1977.

POST, R. M. Transduction of psychosocial stress into the neurobiology of recurrent affective disorder. **Am J Psychiatry**, v. 149, n. 8, p. 999-1010, 1992.

PRUT, L.; BELZUNG, C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. **Eur J Pharmacol**, v. 463, n. 1-3, p. 3-33, 2003.

QIAN, Z. *et al.* . A Phase I Trial to Evaluate the Multiple-Dose Safety and Antitumor Activity of Ursolic Acid Liposomes in Subjects with Advanced Solid Tumors. **BioMed Research International**,

RAINER, Q. *et al.* . Functional status of somatodendritic serotonin 1A autoreceptor after long-term treatment with fluoxetine in a mouse model of anxiety/depression based on repeated corticosterone administration. **Mol Pharmacol**, v. 81, n. 2, p. 106-12, 2012a.

RAINER, Q. *et al.* . Beneficial behavioural and neurogenic effects of agomelatine in a model of depression/anxiety. **Int J Neuropsychopharmacol**, v. 15, n. 3, p. 321-35, 2012b.

RAJKOWSKA, G. *et al.* . Morphometric evidence for neuronal and glial prefrontal cell pathology in major depression. **Biol Psychiatry**, v. 45, n. 9, p. 1085-98, 1999.

RAMOS, A. Animal models of anxiety: do I need multiple tests? **Trends Pharmacol Sci**, v. 29, n. 10, p. 493-8, 2008.

RASHEED, N. *et al.* . Involvement of monoamines and proinflammatory cytokines in mediating the anti-stress effects of Panax quinquefolium. **J Ethnopharmacol**, v. 117, n. 2, p. 257-62, 2008.

RESSLER, K. J.; NEMEROFF, C. B. Role of norepinephrine in the pathophysiology and treatment of mood disorders. **Biol Psychiatry**, v. 46, n. 9, p. 1219-33, 1999.

RINWA, P.; KUMAR, A. Piperine potentiates the protective effects of curcumin against chronic unpredictable stress-induced cognitive impairment and oxidative damage in mice. **Brain Res**, v. 1488, p. 38-50, 2012.

_____. Quercetin along with piperine prevents cognitive dysfunction, oxidative stress and neuro-inflammation associated with mouse model of chronic unpredictable stress. **Arch Pharm Res**, 2013.

_____. Modulation of nitrenergic signalling pathway by American ginseng attenuates chronic unpredictable stress-induced cognitive impairment, neuroinflammation, and biochemical alterations. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol**, v. 387, n. 2, p. 129-41, 2014.

RISCH, S. C.; NEMEROFF, C. B. Neurochemical alterations of serotonergic neuronal systems in depression. **J Clin Psychiatry**, v. 53 Suppl, p. 3-7, 1992.

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

RODRIGUES, A. L. *et al.* . Involvement of monoaminergic system in the antidepressant-like effect of the hydroalcoholic extract of *Siphocampylus verticillatus*. **Life Sci**, v. 70, n. 12, p. 1347-58, 2002.

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.

ROSA, P. B. *et al.* . Folic acid prevents depressive-like behavior induced by chronic corticosterone treatment in mice. **Pharmacol Biochem Behav**, 2014.

RUSSO-NEUSTADT, A. A.; CHEN, M. J. Brain-derived neurotrophic factor and antidepressant activity. **Curr Pharm Des**, v. 11, n. 12, p. 1495-510, 2005.

SACHAR, E. J.; BARON, M. The biology of affective disorders. **Annu Rev Neurosci**, v. 2, p. 505-17, 1979.

SARFATI, D. *et al.* . Development of a pharmacy-based comorbidity index for patients with cancer. **Med Care**, v. 52, n. 7, p. 586-93, 2014.

SASAKI, K. *et al.* . Rosmarinus officinalis polyphenols produce antidepressant like effect through monoaminergic and cholinergic functions modulation. **Behav Brain Res**, v. 238, p. 86-94, 2013.

SCHECHTER, L. E. *et al.* . Innovative approaches for the development of antidepressant drugs: current and future strategies. **NeuroRx**, v. 2, n. 4, p. 590-611, 2005.

SCHILDKRAUT, J. J. The catecholamine hypothesis of affective disorders: a review of supporting evidence. **Am J Psychiatry**, v. 122, n. 5, p. 509-22, 1965.

SCHMIDT, H. D.; DUMAN, R. S. Peripheral BDNF produces antidepressant-like effects in cellular and behavioral models. **Neuropsychopharmacology**, v. 35, n. 12, p. 2378-91, 2010.

SCHREIBER, S.; BLEICH, A.; PICK, C. G. Venlafaxine and mirtazapine: different mechanisms of antidepressant action, common opioid-mediated antinociceptive effects--a possible opioid involvement in severe depression? **J Mol Neurosci**, v. 18, n. 1-2, p. 143-9, 2002.

SCHROEDER, H. *et al.* . The effect of pentylenetetrazol kindling on synaptic mechanisms of interacting glutamatergic and opioid system in the hippocampus of rats. **Brain Res**, v. 811, n. 1-2, p. 40-6, 1998.

SHAW, A. M. *et al.* . Antidepressant-like effects of novel triple reuptake inhibitors, PRC025 and PRC050. **Eur J Pharmacol**, v. 555, n. 1, p. 30-6, 2007.

SHIH, Y. H. *et al.* . Ursolic acid protects hippocampal neurons against kainate-induced excitotoxicity in rats. **Neurosci Lett**, v. 362, n. 2, p. 136-40, 2004.

SHOPSIN, B.; FRIEDMAN, E.; GERSHON, S. Parachlorophenylalanine reversal of tranylcypromine effects in depressed patients. **Arch Gen Psychiatry**, v. 33, n. 7, p. 811-9, 1976.

SHOPSIN, B. *et al.* . Use of synthesis inhibitors in defining a role for biogenic amines during imipramine treatment in depressed patients. **Psychopharmacol Commun**, v. 1, n. 2, p. 239-49, 1975.

SILVA, M. C. *et al.* . Augmentation therapy with alpha-lipoic acid and desvenlafaxine: a future target for treatment of depression? **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol**, v. 386, n. 8, p. 685-95, 2013.

SOARES, C. N.; ZITEK, B. Reproductive hormone sensitivity and risk for depression across the female life cycle: a continuum of vulnerability? **J Psychiatry Neurosci**, v. 33, n. 4, p. 331-43, 2008.

SOMOVA, L. O. *et al.* . Cardiovascular, antihyperlipidemic and antioxidant effects of oleanolic and ursolic acids in experimental hypertension. **Phytomedicine**, v. 10, n. 2-3, p. 115-21, 2003.

STEIN, M. B. *et al.* . Social anxiety disorder and the risk of depression: a prospective community study of adolescents and young adults. **Arch Gen Psychiatry**, v. 58, n. 3, p. 251-6, 2001.

STERNER, E. Y.; KALYNCHUK, L. E. Behavioral and neurobiological consequences of prolonged glucocorticoid exposure in rats: relevance to depression. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 34, n. 5, p. 777-90, 2010.

STERU, L. *et al.* . The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 85, n. 3, p. 367-70, 1985.

STOLL, A. L.; RUETER, S. Treatment augmentation with opiates in severe and refractory major depression. **Am J Psychiatry**, v. 156, n. 12, p. 2017, 1999.

TABASSUM, I.; SIDDIQUI, Z. N.; RIZVI, S. J. Effects of *Ocimum sanctum* and *Camellia sinensis* on stress-induced anxiety and depression in male albino *Rattus norvegicus*. **Indian J Pharmacol**, v. 42, n. 5, p. 283-8, 2010.

TAIWO, A. E. *et al.* . Anxiolytic and antidepressant-like effects of *Melissa officinalis* (lemon balm) extract in rats: Influence of administration and gender. **Indian J Pharmacol**, v. 44, n. 2, p. 189-92, 2012.

TAKATSU-COLEMAN, A. L. *et al.* . Short-term social isolation induces depressive-like behaviour and reinstates the retrieval of an aversive task: mood-congruent memory in male mice? **J Psychiatry Neurosci**, v. 38, n. 4, p. 259-68, 2013.

TAVIANO, M. F. *et al.* . Ursolic acid plays a role in *Nepeta sibthorpii* Bentham CNS depressing effects. **Phytother Res**, v. 21, n. 4, p. 382-5, 2007.

TAYLOR, C. *et al.* . Mechanisms of action of antidepressants: from neurotransmitter systems to signaling pathways. **Cell Signal**, v. 17, n. 5, p. 549-57, 2005.

TAYLOR, W. D. *et al.* . Influence of serotonin transporter promoter region polymorphisms on hippocampal volumes in late-life depression. **Arch Gen Psychiatry**, v. 62, n. 5, p. 537-44, 2005.

TEJEDOR-REAL, P. *et al.* . Implication of endogenous opioid system in the learned helplessness model of depression. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 52, n. 1, p. 145-52, 1995.

TEJEDOR-REAL, P. *et al.* . Involvement of delta-opioid receptors in the effects induced by endogenous enkephalins on learned helplessness model. **Eur J Pharmacol**, v. 354, n. 1, p. 1-7, 1998.

THIERRY, B. *et al.* . The tail suspension test: ethical considerations. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 90, n. 2, p. 284-5, 1986.

THRONSON, L. R.; PAGALILAUAN, G. L. Psychopharmacology. **Med Clin North Am**, v. 98, n. 5, p. 927-958, 2014.

TING, J. T.; FENG, G. Neurobiology of obsessive-compulsive disorder: insights into neural circuitry dysfunction through mouse genetics. **Curr Opin Neurobiol**, v. 21, n. 6, p. 842-8, 2011.

TRULLAS, R.; SKOLNICK, P. Functional antagonists at the NMDA receptor complex exhibit antidepressant actions. **Eur J Pharmacol**, v. 185, n. 1, p. 1-10, 1990.

TSAI, S. J.; YIN, M. C. Antioxidative and anti-inflammatory protection of oleanolic acid and ursolic acid in PC12 cells. **J Food Sci**, v. 73, n. 7, p. H174-8, 2008.

VAN DONKELAAR, E. L. *et al.* . Long-Term Corticosterone Exposure Decreases Insulin Sensitivity and Induces Depressive-Like Behaviour in the C57BL/6NCrl Mouse. **PLoS One**, v. 9, n. 10, p. e106960, 2014.

VASKIVUO, T. E. *et al.* . Role of apoptosis, apoptosis-related factors and 17beta-hydroxysteroid dehydrogenases in human corpus luteum regression. **Mol Cell Endocrinol**, v. 194, n. 1-2, p. 191-200, 2002.

VERANO, J. *et al.* . Ursolic acid from *Agastache mexicana* aerial parts produces antinociceptive activity involving TRPV1 receptors, cGMP and a serotonergic synergism. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 110, p. 255-64, 2013.

VILPOUX, C. *et al.* . Differential effects of chronic antidepressant treatments on micro- and delta-opioid receptors in rat brain. **Eur J Pharmacol**, v. 443, n. 1-3, p. 85-93, 2002.

WANG, G. *et al.* . Systematic correlation between spine plasticity and the anxiety/depression-like phenotype induced by corticosterone in mice. **Neuroreport**, v. 24, n. 12, p. 682-7, 2013.

WANG, W. *et al.* . Deficiency in endocannabinoid signaling in the nucleus accumbens induced by chronic unpredictable stress. **Neuropsychopharmacology**, v. 35, n. 11, p. 2249-61, 2010.

WANG, Y. *et al.* . Venlafaxine modulates depression-induced behaviour and the expression of Bax mRNA and Bcl-x1 mRNA in both hippocampus and myocardium. **Hum Psychopharmacol**, v. 26, n. 2, p. 95-101, 2011.

WANG, Y. J. *et al.* . Ursolic acid attenuates lipopolysaccharide-induced cognitive deficits in mouse brain through suppressing p38/NF-kappaB mediated inflammatory pathways. **Neurobiol Learn Mem**, v. 96, n. 2, p. 156-65, 2011.

WEISS, J. M. Does decreased sucrose intake indicate loss of preference in CMS model? **Psychopharmacology (Berl)**, v. 134, n. 4, p. 368-70; discussion 371-7, 1997.

WILKINSON, K. *et al.* . A high content drug screen identifies ursolic acid as an inhibitor of amyloid beta protein interactions with its receptor CD36. **J Biol Chem**, v. 286, n. 40, p. 34914-22, 2011.

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.

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

WILLNER, P.; MUSCAT, R.; PAPP, M. Chronic mild stress-induced anhedonia: a realistic animal model of depression. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 16, n. 4, p. 525-34, 1992.

WILLNER, P.; SCHEEL-KRUGER, J.; BELZUNG, C. The neurobiology of depression and antidepressant action. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 37, n. 10 Pt 1, p. 2331-71, 2013.

WONG, M. L.; LICINIO, J. Research and treatment approaches to depression. **Nat Rev Neurosci**, v. 2, n. 5, p. 343-51, 2001.

WU, D. M. *et al.* . Ursolic acid improves domoic acid-induced cognitive deficits in mice. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 271, n. 2, p. 127-36, 2013.

WU, L. M. *et al.* . Chronic unpredictable stress decreases expression of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in mouse ovaries: relationship to oocytes developmental potential. **PLoS One**, v. 7, n. 12, p. e52331, 2012a.

WU, L. M. *et al.* . Inhibition of follicular development induced by chronic unpredictable stress is associated with growth and differentiation factor 9 and gonadotropin in mice. **Biol Reprod**, v. 86, n. 4, p. 121, 2012b.

WU, T. C. *et al.* . Mineralocorticoid receptor antagonist spironolactone prevents chronic corticosterone induced depression-like behavior. **Psychoneuroendocrinology**, v. 38, n. 6, p. 871-83, 2013.

XU, Z. *et al.* . Chronic corticosterone administration from adolescence through early adulthood attenuates depression-like behaviors in mice. **J Affect Disord**, v. 131, n. 1-3, p. 128-35, 2011.

YABE, T. *et al.* . Ferulic acid induces neural progenitor cell proliferation in vitro and in vivo. **Neuroscience**, v. 165, n. 2, p. 515-24, 2010.

YALCIN, I.; AKSU, F.; BELZUNG, C. Effects of desipramine and tramadol in a chronic mild stress model in mice are altered by yohimbine but not by pindolol. **Eur J Pharmacol**, v. 514, n. 2-3, p. 165-74, 2005.

YOO, K. Y.; PARK, S. Y. Terpenoids as potential anti-Alzheimer's disease therapeutics. **Molecules**, v. 17, n. 3, p. 3524-38, 2012.

YOON, S. H. *et al.* . Chronic non-social stress affects depressive behaviors but not anxiety in mice. **Korean J Physiol Pharmacol**, v. 18, n. 3, p. 263-8, 2014.

YU, H. Y. *et al.* . Baicalin reverse AMPA receptor expression and neuron apoptosis in chronic unpredictable mild stress rats. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 451, n. 4, p. 467-72, 2014.

ZARATE, C. *et al.* . New paradigms for treatment-resistant depression. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1292, n. 1, p. 21-31, 2013.

ZARATE, C. A. *et al.* . Modulators of the glutamatergic system: implications for the development of improved therapeutics in mood disorders. **Psychopharmacol Bull**, v. 36, n. 4, p. 35-83, 2002.

ZHANG, Z. *et al.* . Blockade of 2-arachidonoylglycerol hydrolysis produces antidepressant-like effects and enhances adult hippocampal neurogenesis and synaptic plasticity. **Hippocampus**, 2014.

ZHAO, C. *et al.* . A phase I clinical trial of ursolic acid nanoliposome for evaluating its single-dose tolerance and safety. **Chinese Journal of New Drugs**, v. 20, n. 2, p. 148-151, 2011.

ZHAO, Y. *et al.* . Beneficial effects of benzodiazepine diazepam on chronic stress-induced impairment of hippocampal structural plasticity and depression-like behavior in mice. **Behav Brain Res**, v. 228, n. 2, p. 339-50, 2012.

ZHAO, Y. *et al.* . The varying effects of short-term and long-term corticosterone injections on depression-like behavior in mice. **Brain Res**, v. 1261, p. 82-90, 2009.

ZHU, L. *et al.* . The role of goal adjustment in symptoms of depression, anxiety and fatigue in cancer patients receiving psychosocial care: a longitudinal study. **Psychol Health**, p. 1-35, 2014.

ZHU, Z. *et al.* . A phase I pharmacokinetic study of ursolic acid nanoliposomes in healthy volunteers and patients with advanced solid tumors. **Int J Nanomedicine**, v. 8, p. 129-36, 2013.