



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA

CENTRO DE CIÊNCIAS HUMANAS, LETRAS E ARTES

DEPARTAMENTO DE PSICOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIA COGNITIVA E
COMPORTAMENTO

EFEITO ANTIDEPRESSIVO DO TRANS-ANETOL EM CAMUNDONGOS SWISS
FÊMEAS: ESTUDO COMPORTAMENTAL E NEUROQUÍMICO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

CÉSAR ALVES CARNEIRO

JOÃO PESSOA, PB, BRASIL

2019

EFEITO ANTIDEPRESSIVO DO TRANS-ANETOL EM CAMUNDONGOS SWISS
FÊMEAS: ESTUDO COMPORTAMENTAL E NEUROQUÍMICO

Por:

César Alves Carneiro

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociência Cognitiva e Comportamento, da Universidade Federal da Paraíba, como requisito para obtenção do grau de Mestrado em Neurociência Cognitiva e Comportamento.

Orientadora: Mirian Graciela da Silva Stiebbe Salvadori

Co-orientador: Sócrates Golzio Dos Santos

João Pessoa, PB, Brasil

2019

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

C289e Carneiro, Cesar Alves.

EFETO ANTIDEPRESSIVO DO TRANS-ANETOL EM CAMUNDONGOS
SWISS FÊMEAS: ESTUDO COMPORTAMENTAL E NEUROQUÍMICO /
Cesar Alves Carneiro. - João Pessoa, 2019.
73 f. : il.

Orientação: Mirian Graciela da Silva Stiebbe Salvadori.
Coorientação: Sócrates Golzio Dos Santos.
Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCHLA.

1. Depressão; Estresse Subcrônico; Trans-anetol. I.
Salvadori, Mirian Graciela da Silva Stiebbe. II.
Santos, Sócrates Golzio Dos. III. Título.

UFPB/BC

**EFEITO ANTIDEPRESSIVO DO TRANS-ANETOL EM CAMUNDONGOS
SWISS FÊMEAS: ESTUDO COMPORTAMENTAL E NEUROQUÍMICO**

César Alves Carneiro

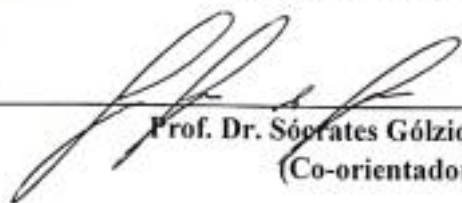
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociência Cognitiva e Comportamento do Centro de Ciências Humanas, Letras e Artes da Universidade Federal da Paraíba para obtenção do grau de MESTRE EM NEUROCIÊNCIA COGNITIVA E COMPORTAMENTO – Área de concentração: Neurociência Cognitiva Pré-Clinica e Clínica.

Aprovado em: João Pessoa, 05/12/19

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr.ª Mirian Graciela Da Silva Stiebbe Salvadori
(Orientadora/UFPB)



Prof. Dr. Sócrates Gólzio dos Santos
(Co-orientador)

Prof. Dr. Flávio Freitas Barbosa
(Membro Interno)



Prof. Dr. Diogo Vilar da Fonseca
(Membro Externo)

“Quando a verdade ofende, nós mentimos e mentimos, até que não nos lembramos mais que ela existe, mas a verdade ainda existe. Cada mentira que contamos gera uma dívida com a verdade. Cedo ou tarde essa dívida deve ser paga.” **Valery Legasov, Chernobyl.**

A minha família, amigos e todos os
animais que foram utilizados na pesquisa.

Agradecimentos

Sou grato inicialmente Deus, por ter me permitido tudo, dos erros aos acertos para finalmente chegar até a conclusão deste trabalho.

Agradeço minha família pelo suporte: Josenildo, Cleide, Kaio. A família que me também me acolheu: Cremilda, Cledinaldo, Lucas. E a minha avó Gentila por tudo.

Aos amigos que a vida me premiou Pedro, Lucas, Danilo, Ricardo, Guilherme, Brunna, Larissa e André.

A Aline e Erika, que a pesquisa me permitiu dividir a carga, as alegrias e os lanches.

Aos que o mestrado me presenteou Thiago, Egina, Ana Paula, Laís, Maria Paula.

A Profª Maria Regina, Prof. Alexandre Palma e Prof. Pedro Estrela, meus chefes, que compreendem a necessidade de minha formação e auxiliam nesse processo.

Aos alunos Luiz Henrique, Luciano, Acleiba, Thayna e Rafaela pela ajuda no trabalho, assim como meus colegas Yen e Maria do Céu e Roberto.

Aos alunos IC em especial Thamires e Breno pela ajuda nos experimentos, assim como os demais colegas de laboratório Yann, Kaique, Caio, Tayla, Poliane, Adrielle, Evelyn, Diego e Carla.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Neurociência Cognitiva e Comportamento pela minha formação e auxílio em especial Prof. Flávio, Profª Melyssa, Profª Anna Alice e Prof Reinaldo.

Ao Prof. Lendro por ser uma força de animo em meio ao caos que pode ser uma pesquisa.

A Profª Adriana por ser sempre disponível, acessível e compreensível quanto a ensinar um aluno por caminhos que nunca pensou trilhar.

Ao Prof. Socrates, por todo o auxílio na sua co-orientação e sua fé e confiança que um aluno de neurociências poderia aprender sobre cromatografia.

A Profª Mirian por ser uma orimãe, sempre disposta a fazer o que acredita ser melhor para o aluno e também para a pesquisa.

A Universidade Federal da Paraíba e a todos que de alguma forma me auxiliaram nessa caminhada.

RESUMO

A depressão é um transtorno de origem multifatorial caracterizado pelo humor deprimido. Pesquisas identificaram uma relação entre estresse e depressão. O estresse promove o aumento desenfreado de cortisol que em quantidades elevadas promove alterações estruturais e bioquímicas no Sistema Nervoso Central (SNC) podendo levar ao Transtorno Depressivo Maior (TDM). Devido à complexidade deste transtorno a investigação por novas alternativas de tratamento é constante para se obter o bem-estar dos pacientes. Assim nessa busca por novos tratamentos, as substâncias originárias de plantas aromáticas, principalmente dos óleos essenciais se mostram com diversas atividades biológicas. Dentre esses constituintes o trans-anetol tem se mostrado uma molécula com potencial ação antioxidante, anti-inflamatório e ansiolítico. Devido estas atividades, objetivamos investigar se o trans-anetol possui ação antidepressiva sobre camundongos fêmeas adultas submetidas por quatorze dias ao modelo do estresse subcrônico imprevisível (ESI). Foram utilizados seis grupos, com um grupo não estressado e cinco grupos que passaram pelo ESI, que após os sete dias iniciais de protocolo foram subdivididos em ESI salina, ESI imipramina (15 mg/kg) e ESI tratado com doses de 100, 200 e 300 mg/kg de trans-anetol. Ao final do protocolo foram realizados os testes de suspensão da cauda, borrifagem da sacarose para avaliar a ação antidepressiva e campo aberto para atividade locomotora, os animais foram eutanasiados e retirado o hipocampo para análise neuroquímica. Na avaliação da variação ponderal o grupo estresse teve redução do ganho de peso em relação ao não estressado, os animais nas doses de 200 e 300 mg/kg tiveram perda de peso em comparação ao início do protocolo. No teste da borrifagem da sacarose as três doses do trans-anetol conseguiram reduzir o tempo de latência, no tempo de autocuidado a dose de 200mg/kg foi superior ao grupo ESI. Na suspensão da cauda a latência para a imobilidade não diferiu nas doses do trans-anetol, apenas os grupos imipramina e controle diferiram do ESI, no tempo de imobilidade a dose de 200mg/kg possuiu o melhor resultado diferindo do grupo ESI. No campo aberto, o trans-anetol (100 e 200mg/kg) conseguiu aumentar a quantidade de rearings em relação aos animais estressados; no parâmetro número de cruzamentos a dose de 100mg/kg teve o melhor desempenho; por fim no tempo de permanência no centro a dose de 200mg/kg foi maior em relação ao grupo estresse. Na avaliação neuroquímica, o cortisol foi encontrado em nível elevado no hipocampo dos animais ESI, todas as doses do trans-anetol conseguiram reduzir significativamente seus níveis. Ao quantificar a via serotoninérgica o trans-anetol conseguiu reduzir a degradação de serotonina nas doses de 200 e 300mg/kg. Na via dopaminérgica, as melhores doses foram de 100 e 300 mg/kg por não promoveram um aumento da degradação de dopamina. Os resultados encontrados sugerem que o trans-anetol não interfere na atividade locomotora, e ainda promove comportamento de anedonia dos animais submetidos a um protocolo de estresse, além de reduzir níveis de cortisol e atuar sobre as vias serotoninérgicas e dopaminérgicas.

Palavras-chaves: Depressão, Estresse Subcrônico Imprevisível, Trans-anetol, Fêmeas, Neuroquímico.

ABSTRACT

Depression is a multifactorial disorder characterized by depressed mood. Research has identified a relationship between stress and depression. Stress promotes the unbridled increase of cortisol which in high amounts promotes structural and biochemical changes in the Central Nervous System (CNS) and may lead to Major Depressive Disorder (MDD). Due to the complexity of this disorder the investigation for new treatment alternatives is constant to obtain the well-being of patients. Thus, in this search for new treatments, substances originating from aromatic plants, especially essential oils, are shown to have several biological activities. Among these constituents, trans-anethole has been shown to be a molecule with potential antioxidant, anti-inflammatory and anxiolytic action. Due to these activities, we aimed to investigate whether trans-anethole has antidepressant action on adult female mice submitted for fourteen days to the unpredictable subchronic stress (ESI). Six groups were used, one non-stressed group and five groups that underwent ESI, which after the initial seven days of protocol were subdivided into ESI saline, ESI imipramine (15 mg / kg) and ESI treated with doses of 100, 200 and 300 mg / kg trans-anethole. At the end of the protocol, tail suspension tests, sucrose spraying were performed to evaluate antidepressant action and open field for locomotor activity, the animals were euthanized and the hippocampus was removed for neurochemical analysis. In the assessment of weight variation, the stress group had a reduction in weight gain compared to the non-stressed group, animals at 200 and 300 mg / kg had weight loss compared to the beginning of the protocol. In the sucrose spraying test, the three trans-anethole doses reduced the latency time; in the self-care time the 200 mg / kg dose was higher than the ESI group. In the tail suspension the immobility latency did not differ in trans-anethole doses, only the imipramine and control groups differed from ESI, in the immobility time the 200mg / kg dose had the best result differing from the ESI group. In the open field, trans-anethole (100 and 200mg / kg) was able to increase the amount of rearings in relation to stressed animals; In the parameter number of crossings the dose of 100mg / kg had the best performance; Finally in the time of stay in the center the dose of 200mg / kg was higher in relation to the stress group. In the neurochemical evaluation, cortisol was found at high level in the hippocampus of the ESI animals, all trans-anethole doses were able to significantly reduce its levels. By quantifying the serotonergic pathway trans-anethole was able to reduce serotonin degradation at doses of 200 and 300mg / kg. In the dopaminergic route, the best doses were 100 and 300 mg / kg because they did not promote an increase of dopamine degradation. The results suggest that trans-anethole does not interfere with locomotor activity, and also promotes anhedonia behavior of animals submitted to a stress protocol, besides reducing cortisol levels and acting on serotonergic and dopaminergic pathways.

Keywords: Depression, Unpredictable Subchronic Stress, Trans-Anethole, Females, Neurochemical.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Via Serotoninérgica e Dopaminérgica. Produzido pelo Autor.	18
Figura 2 - Interação via inflamatória com neurotransmissão. Fonte: Carneiro, 2017.	20
Figura 3- Eixo Hipófise-Pituitária-Adrenal (HPA). Produzido pelo Autor.	21
Figura 4- Estrutura Química do Trans-anetol. Fonte: Sigma-Aldrich.	24
Figura 5 - Desenho do Estudo.	31
Figura 6- Teste de Suspensão da Cauda (TST).	31
Figura 7- Splash Test (Borrifagem de sacarose).	32
Figura 8- Teste do Campo Aberto. Em campo circular.	32
Figura 9- Processamento das Amostras para Análise Neuroquímica.	33
Figura 10- Evolução ponderal dos animais em percentual. A) Variação de peso até o sétimo dia de protocolo. B) Variação de peso entre o sétimo e decimo quarto dia de protocolo. ANOVA Two Way, teste de Bonferroni. a, $p < 0,01$; b, $p < 0,001$; em relação ao grupo controle. c, $p < 0,001$; em relação ao grupo estresse. d, $p < 0,001$; e, $p < 0,0001$ em relação ao grupo imipramina. (n:7).	35
Figura 11 - A) Latência para Grooming. B) Tempo de Autocuidado. Anova "one way" seguido pelo teste post hoc de Dunnett. $*p < 0,05$; $**p < 0,01$; $***p < 0,001$ em relação ao ESI. (n:8).	36
Figura 12 - A) Latência para Imobilidade. B) Tempo de Imobilidade. ANOVA "one way" seguido pelo teste de post hoc de Dunnett. $*p < 0,05$; $**p < 0,01$; $***p < 0,001$ em relação ao ESI. (n:8). .	36
Figura 13 - A) Número de Rearings. B) Número de Cruzamentos. C) Percentual de Permanência no Centro. ANOVA "one way" seguido pelo teste post hoc de Dunnett. $*p < 0,05$; $**p < 0,01$; $****p < 0,0001$ em relação ao ESI. (n:8).	37
Figura 14 - Concentração de cortisol no hipocampo. ANOVA "one way" seguido pelo teste post hoc de Dunnett. $***p < 0,001$; $****p < 0,0001$ em relação ao ESI. (n:8).	38
Figura 16 - Concentração de Serotonina no hipocampo. ANOVA "one way" seguido pelo teste post hoc de Dunnett. $*p < 0,05$; $****p < 0,0001$ em relação ao ESI (n:8).	38
Figura 15- Concentração de Triptofano no hipocampo. ANOVA "one way" seguido pelo teste post hoc de Dunnett. $*p < 0,05$; $**p < 0,01$ em relação ao ESI (n:8).	38
Figura 17 - Concentração de Ácido 5-hidroxi-indolacético. ANOVA "one way" seguido pelo teste post hoc de Dunnett. $*p < 0,05$; $**p < 0,01$; $***p < 0,001$; $****p < 0,0001$ (n:8-7).	39
Figura 18 - Proporção 5-HT/Triptofano. ANOVA "one way" seguido pelo teste post hoc de Dunnett. $**p < 0,01$; $***p < 0,001$; $****p < 0,0001$ em relação ao ESI (n:7).	39
Figura 19 - Proporção 5-HIAA/5-HT. ANOVA "one way" seguido pelo teste post hoc de Dunnett. $**p < 0,01$, $****p < 0,0002$ em relação ao ESI (n:7).	39
Figura 20 - A) Concentração de Dopamina no hipocampo. B) Concentração DOPAC no hipocampo. ANOVA "one way" seguido pelo teste post hoc de Dunnett. $*p < 0,05$; $**p < 0,01$; $****p < 0,0001$ em relação ao ESI (n:7).	40
Figura 21 - Proporção DOPAC/DOPA. ANOVA "one way" seguido pelo teste post hoc de Dunnett. $**p < 0,01$; $***p < 0,001$ em relação ao ESI (n:7).	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Descrição dos Estressores	29
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

'	Minuto
%	Por cento
±	Mais ou menos
5-HIAA	Ácido 5 hidroxí indol acético
5-HT	Serotonina
ACTH	Hormônio Adrenocorticotrófico
AMPA	Ácido α -amino-3-hidroxí-5-metil-4-isoxazolepropionico
AMPc	Adenosina 3',5'-monofosfato cíclico
ANOVA	Análise de Variância
BDNF	Fator Neurotrófico Derivado Do Cérebro
CID-10	Classificação Internacional de Doenças
cm	Centímetro
CRF	Hormônio Liberador de Corticotrofina
CUMS	Chronic Unpredictable Mild Stress
DA	Dopamina
DOPAC	Ácido 3,4-di-hidroxifenilacético
DSM-V	Manual de Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais – 5 ^a
g	Grama
h	Hora
HPA	Hipófise-Pituitária-Adrenal
i.p.	Via Intraperitoneal
IL-1 β	Interleucina Um Beta
IL-6	Interleucina seis
Kg	Quilograma
mg	Miligrama
min	Minuto
NA	Noradrenalina
NMDA	N-metil D-Aspartato

NO	Óxido Nítrico
°	Grau
°C	Graus Celsius
OE	Óleo Essencial
OMS	Organização Mundial de Saúde
PSD95	Proteína densa pós-sináptica 95
PVN	Núcleo paraventricular
s	Segundo
SPL	Splash Test
TDM	Transtorno Depressivo Maior
™	Marca Comercial
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral Alfa
TST	Teste de Suspensão da Cauda
v.o.	Via Oral

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	14
FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	16
Definição e Epidemiologia.....	16
Fisiopatologia.....	17
Neurotransmissores	18
Teoria das Monoaminas	18
Via Glutamatérgica	18
Via Inflamatória	19
Eixo HPA	20
Modelo Não-Clínico.....	22
Estresse Crônico.....	22
Tratamento farmacológico	23
Óleos Essenciais.....	23
Trans-anetol.....	24
JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA	26
OBJETIVO	27
Objetivo geral.....	27
Objetivos específicos	27
MATERIAIS	28
Animais	28
Substâncias.....	28
Equipamentos	28
MÉTODOS	29
Procedimento Experimental	29
Tratamento	30
Testes Comportamentais	31
Teste de Suspensão da Cauda.....	31
Splash Teste	31
Campo aberto	32
Estudo neuroquímico	32
Gravação e análise dos vídeos.....	33
Análise estatística.....	34
RESULTADO	35
Avaliação Da Atividade Antidepressiva Do Trans-Anetol	35
Evolução ponderal.....	35
Teste de borrifagem de sacarose – Splash Teste	35

Teste de suspensão da cauda	36
Campo aberto	37
Neuroquímico	38
DISCUSSÃO.....	41
CONCLUSÃO.....	50
REFERÊNCIAS	51
ANEXOS.....	67
Anexo A – Certidão de Aprovação do C.E.U.A.	67
Anexo B – Comprovante do Depósito de Patente do Processo de Derivatização	68

INTRODUÇÃO

O Transtorno Depressivo Maior (TDM) é um transtorno psiquiátrico de origem multifatorial e pode ser caracterizada por diferentes tipos de sintomas, como os distúrbios do sono, alteração do apetite, bem como o retardo psicomotor, fadiga, sentimento de inutilidade e/ou culpa e humor deprimido constante (American Psychological Association (APA), 2014). Deste modo, este transtorno psiquiátrico tem sido vinculado a elevados graus de mortalidade e morbidade (Palazidou, 2012).

Sobre a sua epidemiologia, a Organização Mundial da Saúde (OMS) afirma que até 2020 ela se tornará a segunda maior doença no mundo (Stopa et al., 2015). Sua prevalência é maior em mulheres do que homens, em uma proporção de aproximadamente duas vezes maior e isto está relacionado principalmente a fatores hormonais, fisiológicos e fatores externos, destacando-se principalmente os sociais (APA, 2014).

Devido ser um transtorno multifatorial, não é possível determinar uma única causa etiológica podendo ser uma predisposição genética, estresse ambiental, alteração na regulação hormonal e de neurotransmissores. Dentre as teorias que tentam estabelecer uma base fisiológica para o TDM uma das primeiras a ser elaborada é a redução dos níveis de monoaminas, como a serotonina, a noradrenalina e a dopamina na fenda sináptica, levando a comportamento depressivo (Basso et al., 2009; Pizini, 2013; Zalta, 2011).

Outra importante teoria, relaciona o estresse com a elevação e sustentação dos níveis de cortisol – hipercortisolemia - que acarretaria na geração de um quadro depressivo (Neto, 2017). A hipercortisolemia pode desencadear modificações anatômicas em estruturas importantes como hipocampo e corpo estriado resultando em desregulação do eixo hipofise-pituitária-adrenal (HPA), seus mecanismos compensatórios e comprometimento da atividade de neurotransmissores. Alterações na fisiologia destes locais é correlacionada a alterações comportamentais (DeLong, 2000; Neto, 2017).

Existem diferentes formas de tratamento da depressão como as psicoterapias e a terapia com o uso de fármacos antidepressivos. Quanto ao tratamento farmacológico, os fármacos atuais não têm apresentado um resultado de curto prazo, faz-se necessário um período de latência para que ocorra um efeito satisfatório. Este fator de latência associado a condição de que nem sempre o quadro desses pacientes evolui de modo eficaz reduz a aderência ao tratamento (Zhang et al., 2012).

Uma alternativa na busca de novos medicamentos são os produtos oriundos de plantas medicinais, sejam fitocompostos ou fitoterápicos. Alguns deles já estão presentes

na formulação de 25% dos medicamentos industrializados de forma direta ou indireta, e tem ações conhecidas sobre o Sistema Nervoso Central (SNC), porém mais pesquisas são necessárias devido a maioria dos metabolitos secundários desses vegetais ainda não ter uma ação totalmente elucidada sobre o SNC (Sun, 2015; Viña, 2012).

Entre os constituintes de produtos naturais temos o orto-eugenol, 2-alilfenol e metileugenol, encontrados em óleos essenciais e que já possuem pesquisas voltadas para investigar sua ação antidepressiva (Araújo, 2018; Cavalcanti, 2018; Morais, 2018). Dentro da mesma família de constituintes (fenilpropanóides) temos o trans-anetol [trans-1-metoxi-4-(prop-1-enil) benzeno], encontrado como um dos constituintes majoritários no óleo essencial de diversas espécies vegetais como a erva-doce (*Foeniculum vulgare*), o anis estrelado (*Illicium verum*), anis (*Pimpinella anisum*), estragão (*Artemisia dracunculus*), eucalipto (*Eucalyptus globulus*). Um outro ponto importante é sua utilização na indústria como flavorizante e aromatizante (Aazza, Lyoussi & Miguel, 2011; Cavalcanti et al., 2012; Fitsiou et al., 2016).

Em pesquisas de cunho terapêutico, as principais atividades já identificadas do trans-anetol são ação antioxidante, antifúngica e ansiolítico (Aazza, Lyoussi & Miguel, 2011; Aydemir, Çifci, Aviyente & Boşgelmez-Tinaz, 2018; Miyagawa et al., 2014).

Na busca de novos fármacos uma ferramenta é o uso de modelos e testes animais. Em estudos com depressão o uso destas ferramentas é bastante recorrente, devido drogas antidepressivas conseguirem reverter comportamentos do tipo depressivo em animais (diminuição do tempo de imobilidade) tratados. Associado as semelhanças fisiológicas encontradas nos animais submetidos aos protocolos semelhante aos achados clínicos, como em experimentos de estresse crônico ocorre a depleção noradrenérgica central o que também é encontrado em pessoas com depressão (Dias, 2009).

Baseado na importância de se buscar novas terapias farmacológicas para o tratamento da depressão e visto que os produtos de origem natural podem ser uma alternativa, buscamos avaliar o efeito antidepressivo do trans-anetol por meio do estresse subcrônico imprevisível e seu mecanismo de ação.

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Definição e Epidemiologia

A depressão está presente na humanidade desde os primórdios da civilização é um transtorno mental que representa um sério problema de saúde pública principalmente pela elevada morbidade e mortalidade em seus pacientes (Holzmann et al., 2015).

É um transtorno crônico e multifatorial, de curso variável, caracterizado por uma perturbação na regulação do humor, principalmente tendendo ao humor deprimido, com perda de interesse ou prazer em atividades diárias, perda ou ganho significativo de peso sem estar fazendo dieta, sentimento de culpa, desregulação no sono, agitação ou retardo psicomotor, fadiga, irritabilidade, capacidade diminuída para pensar ou se concentrar e ideação suicida (Adebesin, Adeoluwa, Eduviere & Umukoro, 2017; Almeida et al., 2017; Jindal, Mahesh & Bhatt, 2015). O diagnóstico para o transtorno é exclusivamente clínico, onde pelo menos cinco destes sintomas elencados acima, devem perdurar por no mínimo duas semanas e interferir em suas relações pessoais como na família, trabalho, faculdade (Borah, Lahkar & Dasgupta, 2018; Wang et al., 2016).

Esta patologia pode afetar 15% da população em algum momento de sua vida e se tornou a segunda maior causa de incapacidade no mundo em 2010, e de acordo com a OMS 350 milhões de pessoas no mundo já estariam com o transtorno (Czéh, Fuchs, Wiborg & Simon, 2016; Jastrzębska et al, 2017; World Health Organization (WHO), 2017).

Devido este transtorno ter um amplo espectro sobre o humor dos seus pacientes, existem várias classificações como o distúrbio distímico, depressão pós-parto, transtorno afetivo sazonal, transtorno bipolar e o mais comum o transtorno depressivo maior (Park et al., 2018). Para auxiliar os profissionais no diagnóstico diferencial existem as diretrizes elaboradas pelo Manual de Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (DSM-V) e o Código Internacional de Doenças (CID-10).

Sua distribuição no mundo é variável, muito disso se dá pelo fato de que os países realizam de forma diferente este levantamento, além de ser necessário levar em conta a cultura, nível de desenvolvimento, qualidade de vida e religião. Nos Estados Unidos acredita-se que 20% da população possua este transtorno, no Brasil um estudo em 2015 mostrou que este índice é de 7,6% (Beurel, Harrington & Jope, 2013, Stopa et al., 2015).

Apesar desta disparidade existe um fato comum em diversas pesquisas, é que mulheres tendem a ser mais susceptíveis a depressão e sintomas ansiosos, geralmente

duas vezes mais do que homens, isso foi detectado em estudos realizados em países como Canadá (Albert, 2015), Estados Unidos (Kessler, McGonagle, Swartz, Blazer & Nelson, 1993), Brasil (Stopa et al., 2015) e Índia (Grover, Dutt & Avasthi, 2010). Uma das principais justificativas estaria associado a diferenças hormonais, porém é importante também levar em conta a pressão social/cultural, violência e condições sócio econômicas, onde em muitos casos as mulheres estão mais expostas a situações aversivas envolvendo estes contextos (Borah et al., 2018; Correia & Borloti, 2011). Devido esta prevalência o uso de animais do sexo feminino seria uma forma de avaliar se fatores intrínsecos, deixariam estes animais mais susceptíveis aos comportamentos do tipo depressivo, além de permitir uma melhor transposição ao que ocorre na população.

A depressão também costuma estar associada a comportamentos que ainda não se tem estabelecido se poderiam predispor ao transtorno ou a pessoas com depressão maior os buscaria como um mecanismo de escape para os sintomas. Dentre os comportamentos temos o consumo diário de bebida alcoólica e o fumo, mostrando tornar as pessoas três vezes mais suscetíveis a apresentarem o TDM (Farinha et al., 2013; Molina et al., 2012). O sedentarismo também se mostrou cerca de duas vezes mais prevalente em pacientes com TDM (Batista & Ornelas, 2013).

Fatores sociais também demonstram ter um impacto para o desenvolvimento da depressão, como o baixo nível de escolaridade e de renda poderiam predispor ao TDM (Molina et al., 2012; Stopa et al., 2015).

A genética também vem se mostrando importante para a predisposição do transtorno, é possível estimar que 40% dos casos possuem um fator hereditário. A recorrência também é comum nestes pacientes, chegando a 60% para aqueles que tiveram um único episódio depressivo (Borah et al., 2018).

Fisiopatologia

Por ser multifatorial, o Transtorno Depressivo Maior se torna extremamente difícil propor um tratamento que consiga abranger todos os mecanismos relacionados ao desenvolvimento do quadro clínico (Almeida et al., 2017).

As principais teorias sobre os mecanismos fisiológicos da depressão são relacionadas às monoaminas, via glutamatérgica, eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) e processos inflamatórios (Bai et al., 2018; Wu et al., 2016).

Neurotransmissores

Teoria das Monoaminas

As monoaminas são uma classe de neurotransmissores que possuem um papel essencial na regulação de diversas funções cerebrais como cognição, controle motor, regulação do sono, apetite, entre outros. Dentre os principais temos a serotonina (5-HT), a dopamina (DA) e a noradrenalina (NA) (Zhang et al, 2018). Problemas na neurotransmissão ou nos receptores destas monoaminas se mostram relacionadas com o transtorno depressivo maior (Holzmann et al., 2015).

A hipótese do desequilíbrio destes neurotransmissores foi uma das primeiras a ser elencada para a causa da depressão e foi confirmada pelo mecanismo de ação dos primeiros antidepressivos descobertos a exemplo da iproniazida e da imipramina, ao se estudar como elas atuavam sobre o organismo se identificou que promoviam a elevação da concentração de 5-HT e NA na fenda sináptica, reduzindo sua recaptação ou inibindo a enzima responsável pela sua degradação (Holanda et al., 2016).

A partir de então, novos medicamentos foram desenvolvidos focados em atuar sobre os mecanismos relacionados a esses neurotransmissores, como inibidores de sua recaptação ou de enzimas responsáveis por sua degradação e também agonistas de seus receptores (Czéh, Fuchs, Wiborg & Simon, 2016).

Entretanto esta teoria se mostrou limitada com o tempo, ao não explicar o amplo espectro de alterações estruturais encontrados em pacientes deprimidos, associado ao fato do tratamento requerer um período longo de administração para demonstrar respostas clínicas (quatro a seis semanas) e mesmo assim reverter o quadro de 65% dos pacientes com o transtorno (Sufka & White, 2013). Isso resultou em novas pesquisas envolvendo outras vias que poderiam estar conectadas e promover os sintomas depressivos.

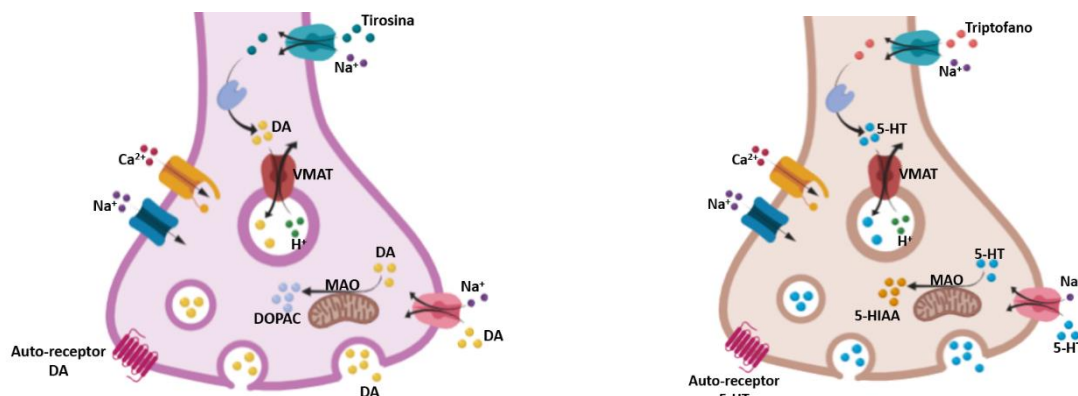


Figura 1- Via Serotonérgica e Dopaminérgica.
Produzido pelo Autor.

Via Glutamatérgica

Outro neurotransmissor que se mostrou importante para compreender o desenvolvimento da depressão foi o glutamato, principal neurotransmissor excitatório, e ativa os seus receptores (AMPA), N-metil-D-aspartato (NMDA) e cainato (Figura 1). Estudos mostraram que seus níveis são alterados em pacientes depressivos e em alguns modelos animais que simulam o TDM (Seese et al., 2013).

Estudos em humanos comprovaram a ação antidepressiva da cetamina, antagonista não competitivo do receptor NMDA, que apresentou efeito em poucas horas e duraram em torno de 10 dias, efeito que pode ser prolongado com injeções repetidas da cetamina em baixas doses (Belujon & Grace, 2014; Sufka & White 2013).

Outras substâncias que atuam sobre a regulação de receptores AMPA mostraram em estudos com animais, reduzir comportamentos do tipo depressivo e aumentar a potência de antidepressivos com ação sobre a via monoaminérgica (Seese et al., 2013).

Apesar da cetamina se apresentar como uma ótima alternativa, seu uso clínico tem sido limitado por ter caráter psicomimético, provocar leve interferência nos processos de memória e ter potencial de se tornar uma droga de abuso (Zhang et al., 2016).

Via Inflamatória

A relação do sistema imune com a regulação de humor vem ganhando um crescente destaque nas pesquisas, pois as teorias anteriormente citadas ainda não eram capazes de solucionar a fisiologia do TDM. Foi possível estabelecer com isso que sinais do sistema imune inato estariam ligados a depressão, como citocinas inflamatórias (IL-6) que estariam elevadas em pacientes deprimidos, entretanto o mecanismo ainda não foi completamente elucidado (Beurel et al., 2013; Wu et al., 2016)

Outras citocinas pró-inflamatórias que apresentaram importância nesse transtorno foram a interleucina -1 β (IL-1 β) e fator de necrose tumoral (TNF- α), que contribuem para a desregulação do eixo HPA promovendo a neurotoxicidade, além de também novas evidências sugerirem que elas alterem o metabolismo de precursores de neurotransmissores, reduzindo sua produção a exemplo da 5-HT, o que mostraria uma ligação da via inflamatória com a teoria monoaminérgica (Figura 2) (Gracia-Rubio et al., 2016).

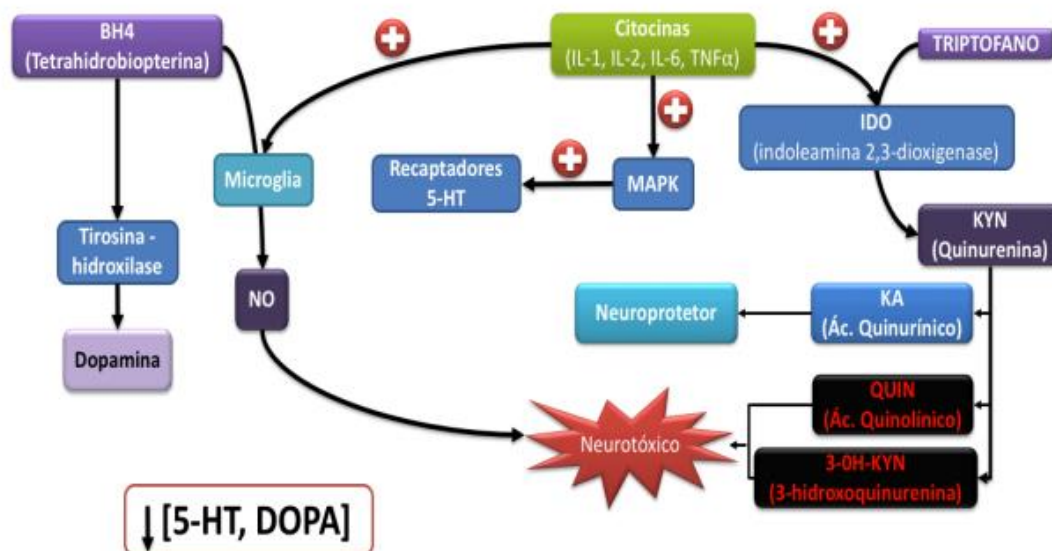


Figura 2 - Interação via inflamatória com neurotransmissão. Fonte: Carneiro, 2017.

Eixo HPA

A relação entre estresse e o TDM sempre esteve presente, a exposição a eventos estressantes são comumente relatados por pessoas que sofrem um episódio depressivo. O estresse não é algo prejudicial, ele auxilia para informar riscos ao organismo mantendo-o em estado de alerta para reagir da melhor forma possível, entretanto quando o estímulo nocivo perdura por um longo tempo ou é muito intenso, pode levar a problemas como desregulação hormonal e problemas neurotóxicos. Como resposta ao estresse, existe a ativação do eixo Hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) que gera alterações no organismo por meio de mineralocorticoides e glicocorticoides como o cortisol (Macedo, Cladouchos, Sifonios, Cassanelli & Wikinski, 2013; Siba, 2013).

A ativação deste eixo ocorre por meio da ação do núcleo paraventricular hipotalâmico (PVN) que é ativado em situações de estresse e secreta corticotrofina (CRF), que atua sobre adenohipófise e promovem a secreção de adrenocorticotropina (ACTH), que ao atingir a circulação sistêmica e chegar ao córtex da glândula adrenal, estimula a síntese e liberação de glicocorticoides, como o cortisol. Esta mesma via possui um mecanismo de autorregulação que envolve o hipocampo e a amígdala, que atuam de forma inibitória e excitatória sobre a atividade do eixo (Figura 3) (Nestler, 2012; Pariente & Lightman, 2008).

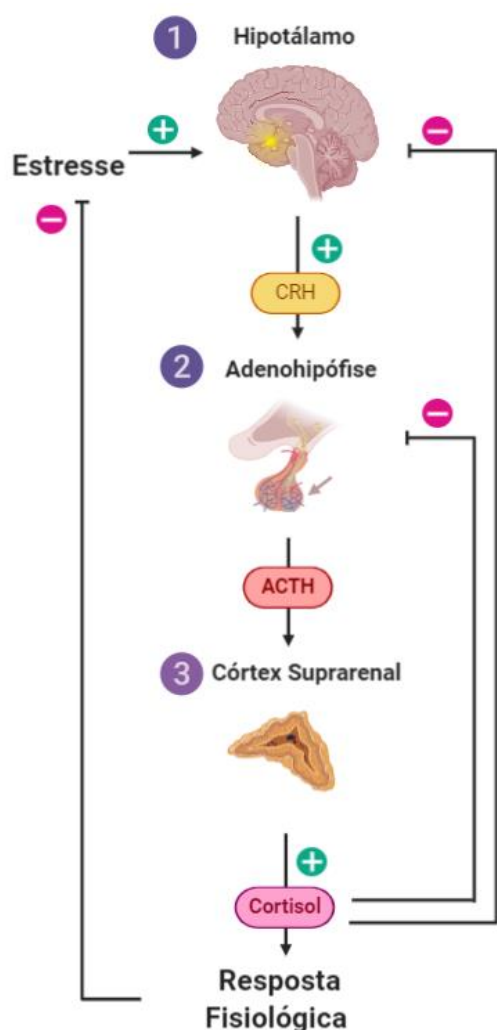


Figura 3- Eixo Hipófise-Pituitária-Adrenal (HPA). Produzido pelo Autor.

O cortisol é um hormônio essencial ao organismo, prepara o corpo para reações de luta ou fuga, além de regular o controle eletrolítico, promover o comportamento de vigia e ajudar no processo de despertar. Entretanto, quando ocorre uma desregulação em algum ponto do eixo HPA resulta em hipercortisolemia, que é prejudicial ao organismo, por ter efeitos deletérios ao sistema circulatório, imunológico e SNC por promover alterações metabólicas e, podendo em casos graves levar a morte (Martino, 2014; Siba, 2013; Zimmermann, 2013).

Dentre as alterações sobre o SNC que a hipercortisolemia causa é a degradação de suas estruturas como o hipocampo, e podendo levar ao comprometimento de funções relacionadas ao aprendizado, memória e também provocar sintomas semelhantes aos encontrados em pacientes com depressão (Chan et al., 2017).

O seu efeito deletério sobre os neurônios

ocorre por meio da hiperatividade de receptores de glicocorticoides que são acionados pelo cortisol, que quando dessensibilizados devido a hipercortisolemia causam hiperativação de enzimas dependentes de cálcio que produzem radicais livres e reduzem a produção de BDNF (Fator neurotrófico derivado do cérebro), ambos associados levam a uma intensa morte celular (Willner, Kruger & Belzung, 2013).

A hipercortisolemia é encontrada na maioria dos pacientes com TDM, o cortisol elevado atua sobre a sinalização intracelular do AMPc, afetando a plasticidade neuronal promovendo a degeneração, característico no TDM, mostrando assim mais um mecanismo da fisiopatologia da doença (Jindal, Mahesh & Bhatt, 2015).

É importante destacar também a relação que existe com outras vias metabólicas relacionadas com a depressão e o cortisol. Este também pode atuar de forma a promover a ação das monoaminooxidasas, enzimas responsáveis pela degradação de 5-HT e NA o que pode levar a redução desses neurotransmissores na fenda sináptica acarretando em

diversas alterações fisiológicas, dentre algumas compatíveis com sintomas depressivos (Willner, Kruger & Belzung, 2013).

Ainda relacionado com este eixo, o CRH demonstra ter interação com o sistema imunológico ativando macrófagos, astrócitos e a micróglia para a produção de citocinas pró-inflamatórias que, quando em níveis elevados, reduzem a formação de neurotransmissores acarretando um quadro depressivo (Vismari, Alves & Neto, 2008).

Modelo Não-Clínico

Como ferramenta essencial para o desenvolvimento de medicamentos, os modelos de estudos não-clínicos ajudam a elucidar a fisiopatologia de diversas doenças, como o transtorno depressivo. Ao longo dos anos, diversos modelos foram criados utilizando várias espécies de animais incluindo os roedores, com o objetivo de mimetizar os resultados comportamentais e fisiológicos encontrados em humanos. Os modelos animais ainda não apresentam capacidade para representar todos os sintomas do transtorno depressivo, porém são significantes devido a conceitos da neurobiologia e bioquímica que conseguiram encontrar características semelhantes a pacientes com transtornos e animais com o comportamento do tipo depressivo (Slattery & Cryan, 2017).

Estresse Crônico

Desenvolvido inicialmente em 1980 buscavam por meio de um regime de estresses gerar a redução de consumo de sacarose que era revertido com tratamento crônico de antidepressivos (Willner, 2017a). Com o tempo a técnica se desenvolveu e se fundamentou na aplicação planejada ou randomizada de estressores em diversas intensidades por um período pré-determinado, onde ao final é possível observar alterações comportamentais como anedonia, ansiedade, variações de peso e da cobertura corporal, redução do volume hipocampal e outras alterações fisiológicas que também são encontrados em pacientes com transtorno depressivo (Willner, 2017b).

Um ponto importante na indução do estresse é a aplicação ou não da imprevisibilidade que é opcional neste protocolo. Entretanto trabalhos indicam que o fato de ser randomizado reduziria a resiliência dos animais e assim eles não conseguiriam se adaptar ao estressor o que auxiliaria no desenvolvimento do comportamento do tipo depressivo (Zhu et al., 2014).

Os mecanismos conhecidos pelos quais este protocolo atua nos animais para ter seu efeito é a desregulação do eixo HPA, causados pelos estressores, que provocariam

uma elevação de cortisol, óxido nítrico, redução do volume do córtex pré-frontal e hipocampo (Lee, Ohno, Ohta & Mikami, 2013) Além de redução de fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), proteína densa pós-sináptica 95 (PSD95), sinaptofisina I e ativação da microglia (Willner, 2017b).

A estrutura deste modelo é bastante variável a depender da metodologia, recomenda-se um período de adaptação ao ambiente (1-14 dias), com um tempo de aplicação dos estressores variando de 14 - 84 dias (Mu et al., 2016; Sun et al., 2016; Tye et al., 2013). Os estressores são diversos, como a inversão do ciclo claro-escuro, natação forçada em água fria, agitação da gaiola, restrição de espaço, dentre outros (Gong et al., 2018).

Tratamento farmacológico

Sabendo da gravidade do transtorno depressivo maior ao longo dos anos, tratamentos foram desenvolvidos como os antidepressivos tricíclicos, inibidores da monoamina oxidase, inibidores seletivos da recaptação da serotonina e inibidores da recaptação de serotonina-noradrenalina, dentre outros. Apesar disto os tratamentos atuais não são totalmente satisfatórios, revertendo em alguns casos os transtornos, mesmo levando um certo tempo (Machado et al., 2013).

Dentre novas alternativas o uso de fitoterápicos, vem surgindo como possibilidade, principalmente devido a sua farmacoterapia oferecer vantagens em termos de segurança e tolerabilidade, também melhorando a adesão do paciente. Dentre os constituintes de plantas aromáticas os óleos essenciais (OE's) são uma alternativa terapêutica (Machado et al., 2013).

Óleos Essenciais

Os OE's são misturas complexas de compostos voláteis presentes em diversas partes das plantas como folhas, casca, raízes e frutos (Leite, Nóbrega & Motta, 2003). Possuem diversas atividades biológicas como antimicrobiano, anti-inflamatório, anticonvulsivante, ansiolítico e antidepressivo (Bakkali, Averbeck, Averbeck, & Idaomar, 2008). Como características físico-químicas costumam ser incolor a ligeiramente amarelado, alta volatilidade em temperatura ambiente e instáveis na presença principalmente de calor, luz e umidade (Simões & Spitzer, 2004)

A sua composição química é formado por um variado conjunto de moléculas orgânicas, como hidrocarbonetos, álcoois, ésteres e cetonas, porém em sua maioria são os terpenos e fenilpropanóides (Bakkali, Averbeck, Averbeck, e Idaomar, 2008).

Os fenilpropanóides são oriundos do metabolismo do ácido chiquímico que gera o ácido p-cumárico e o ácido cinâmico, este último ao sofrer redução da sua cadeia lateral origina o propenilbenzeno também conhecido como anetol e o alilbenzeno (eugenol), ambos considerados análogos estruturais (Silva, 2014).

Alguns fenilpropanóides já foram estudados e encontraram ação antidepressiva como o orto-eugenol, 2-alilfenol e metileugenol, o que poderia indicar que seus análogos poderiam ser moléculas com potencial antidepressivo (Araújo, 2018; Cavalcanti, 2018; Morais, 2018).

Trans-anetol

Dentre os constituintes de óleos essenciais isolados, o trans-anetol [trans-1-metoxi-4-(prop-1-enil) benzeno] (Figura 4) é um fenilpropanóide, à temperatura ambiente se apresenta na forma de cristais brancos, possui ponto de fusão de 21°C e ponto de ebulição de 81°C, sua fórmula química é $C_{10}H_{12}O$ (Souza, 2008).

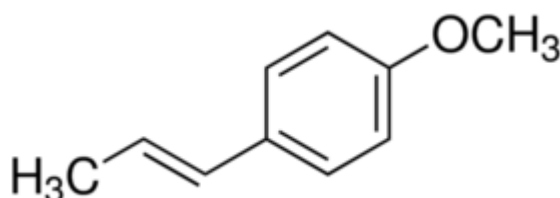


Figura 4- Estrutura Química do Trans-anetol. Fonte: Sigma-Aldrich.

É encontrado em diversas plantas como o anis estrelado (*Illicium verum*), anis (*Pimpinella anisum*), erva-doce (*Foeniculum vulgare*), eucalipto (*Eucalyptus globulus*), estragão (*Artemisia dracunculus*), canelinha (*Croton zehntneri*), hortelã-verde (*Mentha spicata*), manjeriço-da-folha-larga (*Ocimum basilicum*), quincã (*Fortunella margarita*), como composto principal e em menor quantidade em outras como limão, coentro e manjeriço. O isômero trans é usado como flavorizante e aromatizante, enquanto que o isômero cis possui um aroma menos agradável (Aazza, Lyoussi & Miguel, 2011; Almeida, Agra, Maior & De Sousa, 2011; Barber & Newby, 2013; Bartoňková & Dvořák, 2018; Cavalcanti et al., 2012; Fitsiou et al., 2016).

Esta substância não apresenta potencial efeito tóxico ou mutagênico em estudos de curta e longa duração (Nakagawa & Suzuki, 2003), que o tornou uma ferramenta importante na indústria sendo utilizado amplamente como aromatizante pela indústria alimentícia de confeitarias, bebidas alcoólicas e não-alcoólicas, cosméticos, perfumes e produtos de limpeza e na fabricação de medicamentos como flavorizante (Kang, Mukherjee, Min, Kang & Yun, 2018; Muñoz-Acevedo, Kouznetsov & Stashenko, 2009).

Com a investigação da ação terapêutica dos óleos essenciais das plantas anteriormente citadas, verificou-se a presença do trans-anetol e buscou-se identificar que atividades ele poderia exercer isoladamente. Dentre as principais atividades já identificadas temos ação antioxidante, antifúngica, possíveis efeitos antiespasmódicos, gastroprotetores, modulação de adipócitos, ação anti-inflamatória e ansiolítica (Aazza, Lyoussi & Miguel, 2011; Aydemir, Çifci, Aviyente & Boşgelmez-Tinaz, 2018; Cavalcanti et al., 2012; Kang, Mukherjee, Min, Kang & Yun, 2018; Kim, Lee e Seol, 2017; Miyagawa et al., 2014).

Em pesquisa prévia realizada por nosso grupo de pesquisa, foi identificada também uma potencial ação anticonvulsivante do trans-anetol (Guedes, 2017) o que reforça uma ação desta substância sobre o SNC, e associada a outras atividades já comprovadas (antioxidante, anti-inflamatória, ansiolítica) observa-se nesta molécula uma oportunidade para um possível fármaco com ação antidepressiva.

JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA

Sabendo que a depressão é um dos distúrbios mais debilitantes que atinge a humanidade e com perspectivas de aumentar o quadro populacional atingido por esse transtorno, a busca de novos tratamentos se torna um ponto importante para a qualidade de vida destas pessoas. Para isso pesquisas com o objetivo de desenvolver novos fármacos é de suma importância, porém é preciso lembrar de algumas particularidades do TDM ao se montar um modelo de estudo, como o fato de que mulheres costumam ser mais susceptíveis ao transtorno. Para buscar transpor esta característica da patologia ao modelo não-clínico de TDM, o uso de fêmeas se mostra essencial devido possuírem alterações hormonais que corresponderiam as encontradas em humanos.

Substâncias originadas de óleos essenciais como os fenilpropanóides anetol, eugenol e seus derivados já apresentaram atividade antidepressiva como citado anteriormente (Araújo, 2018; Cavalcante, 2018).

O trans-anetol possui uma atividade anti-inflamatória e antioxidante, ambos fatores associados à proteção neuronal. (Facudo et al, 2016; Kouznetsov e Stashenko, 2009; Misharina, Terenina & Krikunova, 2009; Muñoz-Acevedo). E ação ansiolítica revela que essa atividade no nível SNC (Miyagawa et al., 2014).

Assim o presente estudo propicia a investigação de um novo protótipo de fármaco promovendo avanços na pesquisa não-clínica de substâncias encontradas em óleos essenciais. Além disso, compreender as alterações neuroquímicas que os modelos animais podem promover com períodos mais curtos de aplicação de estressores, podendo auxiliar diversos pesquisadores que desejem trabalhar com modelos em depressão.

OBJETIVO

Objetivo geral

Investigar a atividade antidepressiva do trans-anetol em modelo não-clínico de depressão induzido pelo estresse subcrônico imprevisível (ESI).

Objetivos específicos

- Induzir o comportamento tipo depressivo em camundongos fêmeas por meio do estresse subcrônico imprevisível (ESI);
- Acompanhar a evolução ponderal dos animais;
- Explorar a ação antidepressiva do trans-anetol por meio dos testes comportamentais de suspensão de cauda e de borrifagem de sacarose;
- Avaliar se a administração prolongada do trans-anetol altera a atividade locomotora espontânea;
- Realizar estudo neuroquímico para quantificação dos neurotransmissores e seus metabólitos (5-HT, 5-HIAA, DOPA, DOPAC) e outros constituintes como triptofano e cortisol, no hipocampo dos animais.

MATERIAIS

Animais

Foram utilizados camundongos (*Mus musculus*) fêmeas, albinos Swiss, pesando entre 25-30g, com aproximadamente 2-3 meses de idade, todos provenientes do Biotério Prof. Dr. George Thomas da Universidade Federal da Paraíba. Os animais foram alojados sob temperatura ($21 \pm 1^\circ \text{C}$), em gaiolas de polietileno de medidas 30x20x13cm, com a quantidade máxima de 05 camundongos por caixa. Tendo livre acesso a ração tipo *pellets* e água disponíveis em garrafas de polietileno, com ciclo claro/escuro de 12 horas, sendo a fase clara de 6h00 às 18h00.

Os animais que passaram pelos estressores foram alocados em uma sala diferente dos animais controle que não sofreram estresse, este procedimento foi uma medida preventiva para evitar que feromônios ou a vocalização dos animais estressados afetasse o grupo controle. Os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com as recomendações da Lei 11.794 de 08/10/2009, Lei Arouca, e o projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal da Paraíba sob número 6900191118.

Substâncias

- | | |
|--|---|
| • Ácido Fórmico | • Piridina |
| • Água Destilada | • Sacarose 10% |
| • Clorofórmio isopropanol | • Salina 0,9% |
| • Metanol | • Trans-anetol (Sigma – E.U.A.) |
| • N,O-Bis
(trimethylsilyl)trifluoroacetamide) | • Tween 80 (polioxetileno
sorbitano monoelato) (Sigma –
E.U.A.) |

Equipamentos

- | | |
|--------------------------------------|--|
| • Balança analítica | • Vidrarias |
| • Balança semi-analítica | • Pipetador automático |
| • Caixa de Skinner | • Microondas |
| • Caixas de acrílico para observação | • Sistema de Cromatografia Gasosa
acoplado a um Espectromêtro de
Massas do tipo TANDEM com
ionizador do tipo Impacto
Eletrônico (CG-EM por IE) |
| • Campo aberto | |

MÉTODOS

Procedimento Experimental

O experimento se constituiu na indução do comportamento tipo depressivo e avaliação da efetividade do tratamento com trans-anetol em revertê-lo. Inicialmente, os animais passaram por uma adaptação ao ambiente do laboratório e aos experimentadores durante 5 dias e seu peso foi aferido uma vez ao dia até o final do experimento (Schmidt et al., 2010).

Ao final dessa etapa de adaptação os animais foram divididos em dois grupos: 1) Grupo sem estresse e 2) Grupo com estresse.

No grupo sem estresse os animais não receberam nenhum estressor. No grupo estresse, primeiramente, realizou-se a indução do comportamento tipo depressivo, utilizando a metodologia do Estresse Subcrônico Imprevísivel (ESI) adaptado a partir dos trabalhos realizados por Moretti et al. (2012) e Deng et al. (2015) e padronizado em nosso laboratório (Carneiro, 2017).

Esta metodologia consiste na aplicação de uma série de estressores diferentes, duas ou três vezes ao dia de forma randomizada e inesperada por um período de 14 dias.

Tabela 1 - Descrição dos Estressores

Estressor	Descrição
Nado frio	Realizado em uma temperatura de 15°C $\pm$ 1, colocando um animal por vez em recipiente cilíndrico aberto (10 cm de diâmetro e 25 cm de altura) por 3 minutos. Entre cada animal foi realizada a troca de água e limpeza do recipiente (Moretti et al., 2012).
Choque inescapável	Utilizando a caixa de Skinner (caixa em acrílico de 50 x 25 x 25 cm com uma parede de vidro dianteira, cujo piso possui barras de bronze paralelas de 10 mm), os camundongos recebem uma corrente elétrica de 0,7 mA a cada 10s por 3min (Moretti et al., 2012).
Oscilação da caixa	Agitação manual das caixas/gaiolas dos animais, utilizando movimentos suaves por 10 min (Deng et al., 2015);
Superlotação da caixa	Os animais estavam alocados em grupos de 5 por caixa, foram colocados em grupos de 10 por caixa;(Lu et al., 2006).

Restrição do espaço	Os animais foram alocados individualmente em pequenos recipientes, com restrição parcial de movimentação e permaneceram durante uma hora (Moretti et al., 2012).
Inclinação da caixa em 45°	Foram colocadas bases de madeira sob as caixas a fim de promover a inclinação de 45° (Deng et al., 2015).
Maravalha molhada	Colocou-se água sobre a maravalha da caixa dos animais, em uma proporção de 100mL / 50g (água/maravalha) (Deng et al., 2015).
Som do predador	Ruídos selvagens por um período de 6h (Deng et al., 2015).

Tratamento

Para averiguar se o trans-anetol possuía ação antidepressiva, os animais submetidos ao protocolo de estresse subcrônico imprevisível (Grupo estresse) foram então subdivididos em três grupos de tratamento:

- O controle negativo (dez camundongos) receberam por via intraperitoneal (i.p) solução salina (0,9% w/v de cloreto de sódio) em uma concentração de 0,1ml/kg de animal;
- O controle positivo (dez camundongos) receberam palmoato de imipramina, dissolvida em solução salina e administrada por via oral (v.o) em uma dose de 15 mg/kg (Dhingra & Bansal, 2014) a partir do sétimo dia de estresse (Moretti et al., 2012).
- Terceiro grupo de tratamento (trinta camundongos) receberam trans-anetol (Sigma), solubilizada em salina com auxílio do solvente tween 80 (polisorbato 80) e administrada via intraperitoneal (i.p) nas doses de 100, 200 ou 300 mg/kg. Os três subgrupos tiveram seu tratamento iniciado nos últimos sete dias do protocolo de ESI.

No décimo quinto (15^a) dia após a aplicação dos estressores, todos os grupos (com ou sem estresse) passaram pelos testes comportamentais para avaliação das atividades tipo ansiolítica e antidepressiva. Após os testes, os animais foram eutanasiados e o hipocampo removido para posterior análise neuroquímica. Segue abaixo a linha do tempo experimental (Figura 5).

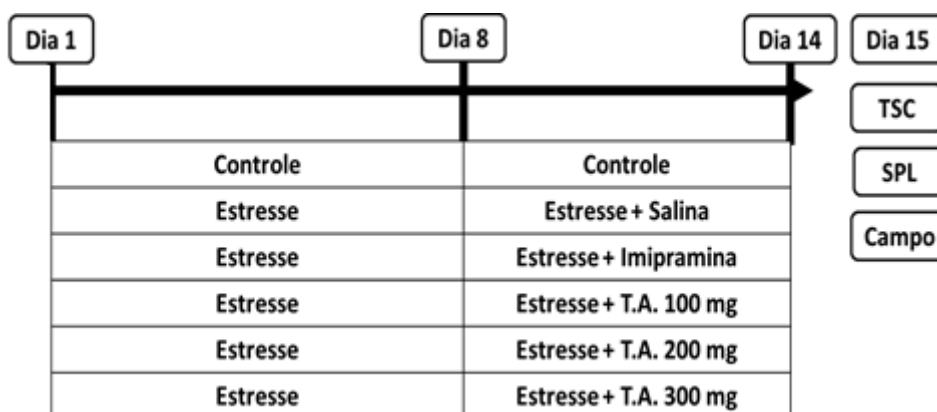


Figura 5 - Desenho do Estudo

Testes Comportamentais

Teste de Suspensão da Cauda

Este é um teste clássico para avaliação da atividade antidepressiva de fármacos (Steru et al., 1985). Nesse caso, o animal é suspenso por sua cauda, de maneira que fique impedido de tocar o chão ou escapar. Sendo assim, o camundongo poderá apresentar um estresse vindo pela tentativa de fuga ou a motivação para continuar tentando. No momento em que o animal desiste da fuga, ele apresenta uma postura imóvel, sendo este a expressão do comportamento depressivo.

Os camundongos foram suspensos, um por vez, presos com uma fita adesiva a cerca de 1 cm da ponta da cauda, numa plataforma aproximadamente 50 cm acima do chão (Figura 6) (Duan et al., 2015; Steru et al., 1985). Os parâmetros de imobilidade e comportamento de escapar foram observados por 6 minutos.



Figura 6- Teste de Suspensão da Cauda (TST)

Splash Teste

O “*splash test*” é utilizado para avaliar o comportamento de auto-limpeza (“grooming”) dos animais, após a borrifagem dos mesmos com solução de sacarose a 10% (Ducottet & Belzung, 2004) no dorso do animal (Figura 7). Este é colocado individualmente dentro de uma caixa de acrílico (9 x 7 x 11 cm). O tempo em que o

animal permanecer no comportamento de auto-limpeza foi cronometrado durante 5 minutos (Isingrini et al., 2010). Em modelos animais de depressão, a administração crônica de antidepressivos clássicos aumenta o tempo despendido neste comportamento (Yalcin et al., 2005).



Figura 7- Splash Test (Borrifagem de sacarose).

Campo aberto

Os animais foram alojados no centro do aparato e buscou-se observar o comportamento exploratório e a locomoção, por um período de 05 minutos, através: a) número de cruzamentos entre os quadrantes; b) percentual de tempo gasto no centro (tempo no centro/tempo nas extremidades)*100; c) quantidade de *rearings* e a latência para a primeira ocorrência (Almeida & Oliveira, 2006). O campo é feito de polietileno com medidas de 40 × 60 × 50 cm de altura e o piso possui 12 quadrados iguais (Figura 8). O aparelho foi higienizado com uma solução de 10% de etanol entre os animais, a fim de ocultar possíveis pistas olfativas.



Figura 8- Teste do Campo Aberto. Em campo circular.

Estudo neuroquímico

Após os testes comportamentais os animais foram então sacrificados por meio de decapitação e o hipocampo retirado, secos em nitrogênio líquido e preservado em freezer

-80°C. Após isto as amostras foram preparadas de acordo com a metodologia adaptada de Xu e colaboradores (2011) (conforme o esquema abaixo). Após estes passos, o material passou pelo processo de derivatização e levado para análise em cromatografia de massa de espectro gasoso.

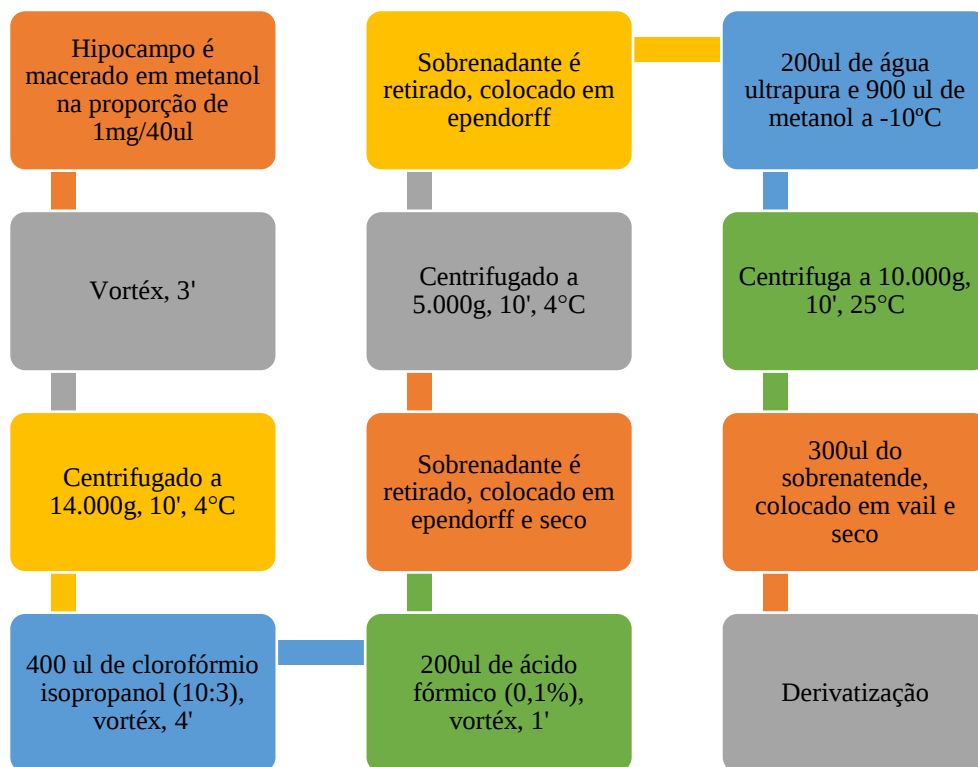


Figura 9- Processamento das Amostras para Análise Neuroquímica.

Gravação e análise dos vídeos

Todos os testes comportamentais, foram gravados utilizando uma câmera digital Canon t3i™.

I) Em seguida os vídeos passaram por uma edição para o tempo de análise indicado para cada teste;

II) Um voluntário, não membro da pesquisa, foi selecionado para fazer a renomeação dos vídeos por meio de códigos;

III) Após, os mesmos vídeos foram distribuídos para dois analistas diferentes (previamente treinados) a fim de analisarem e registrarem os comportamentos observados;

IV) Então, os dados foram enviados para um terceiro analista, e em casos discrepantes, este terceiro analista realizava uma última apreciação dos vídeos;

V) Após, concluída todas as análises dos vídeos, o voluntário informava a codificação original dos grupos.

Análise estatística

Os dados comportamentais foram primeiramente submetidos ao teste de Shapiro para avaliar a normalidade. Em seguida, foi feita a comparação dos grupos por meio do teste ANOVA, seja de uma ou de duas vias, realizando o post-hoc de Dunnet ou Bonferroni. Os dados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média e considerado significativo quando p valor $<0,05$.

RESULTADO

Avaliação Da Atividade Antidepressiva Do Trans-Anetol

Evolução ponderal

Foi realizada a avaliação contínua do peso dos animais durante todo o protocolo, ao décimo quarto dia. Foi possível perceber que o grupo ESI ao final do sétimo dia teve um ganho de peso discreto em relação ao grupo não estressado (Figura 9A)[F(1, 24)=27,71, $p=0,0001$],. Entre o sétimo e o decimo quarto dia com a aplicação dos respectivos tratamentos, se observou uma diferenciação entre os grupos, com destaque para os grupos ESI em relação aos grupos tratados com trans-anetol que tiveram perda significativa de peso (Figura 9B)[F(5,72)=26,64, $p=0,0001$],[F(5,72)=11,03, $p=0,0001$] .

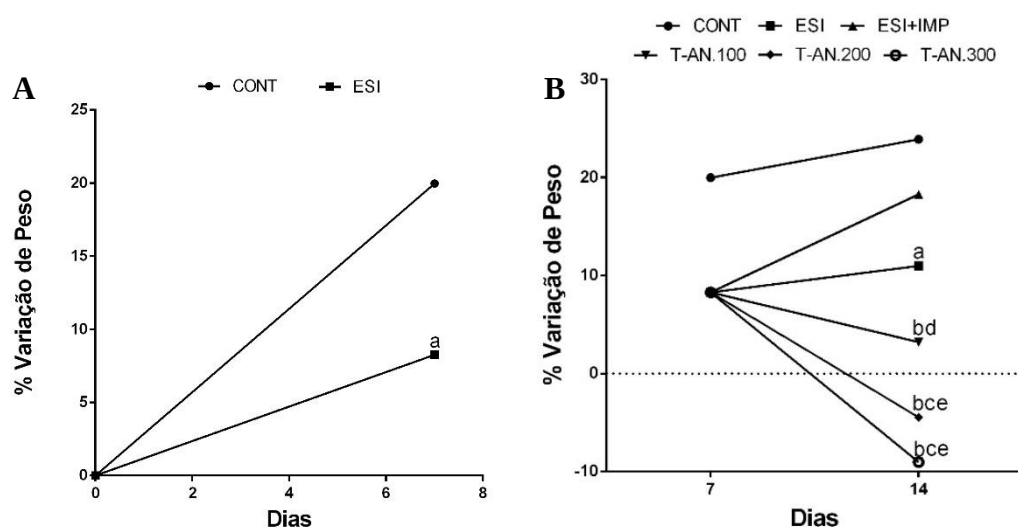


Figura 10- Evolução ponderal dos animais em percentual. A) Variação de peso até o sétimo dia de protocolo. B) Variação de peso entre o sétimo e decimo quarto dia de protocolo. ANOVA Two Way, teste de Bonferroni. a, $p<0,01$; b, $p<0,001$; em relação ao grupo controle. c, $p<0,001$; em relação ao grupo estresse. c, $p<0,001$; e, $p<0,0001$ em relação ao grupo imipramina. (n:7).

Teste de borrifagem de sacarose – Splash Teste

Neste teste foi avaliado a latência para o início do autocuidado e o tempo total de autocuidado que servem como parâmetro para anedonia dos animais. Na latência (Figura 10-A) foi possível observar que o grupo estresse possui um maior tempo para iniciar o grooming diferenciando do grupo controle, imipramina e trans-anetol nas três doses [F(5,42)=4,9, $p=0,0012$].

Ao avaliarmos o tempo total de autocuidado (Figura 10-B) se observou uma diferença estatística [F(5,42)=4,3, $p=0,0028$] entre o grupo estresse com os grupos

controle e as três doses da substância teste, não sendo observado diferença estatística com o grupo imipramina.

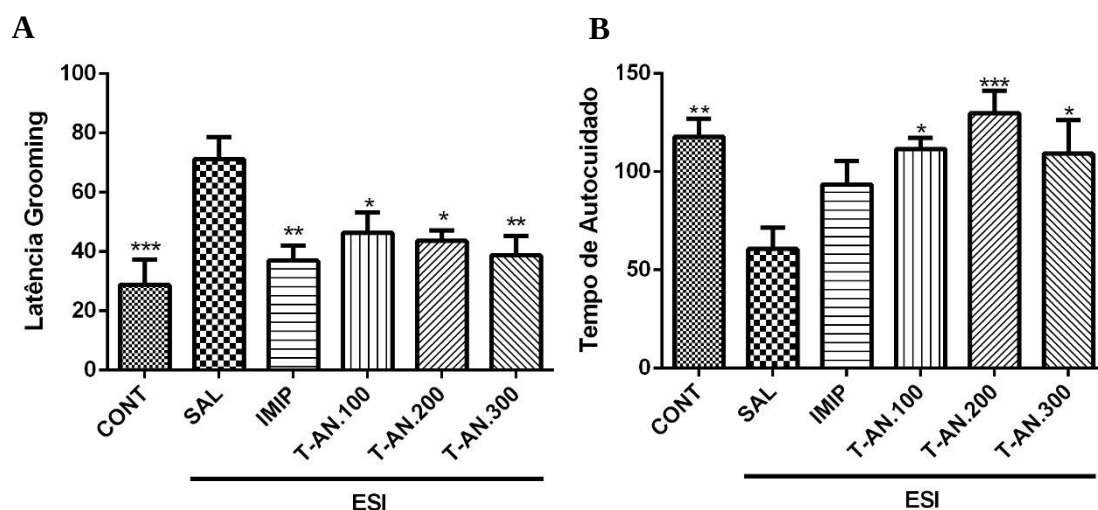


Figura 11 - A) Latência para Grooming. B) Tempo de Autocuidado. Anova "one way" seguido pelo teste *post hoc* de Dunnett. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ em relação ao ESI. (n:8).

Teste de suspensão da cauda

Aqui se identifica o comportamento de autopreservação do animal, analisando a latência e tempo total para o comportamento de imobilidade. Para a latência (Figura 11-A) o grupo controle e imipramina foram os únicos que diferenciaram do estresse [$F(5,42)10,2$, $p=0,0001$]. Na avaliação do tempo de imobilidade (Figura 11-B) os grupos controle e tratamento nas doses de 200 e 300 mg/kg foram estatisticamente diferentes do grupo ESI [$F(5,42)=4,5$, $p=0,0020$].

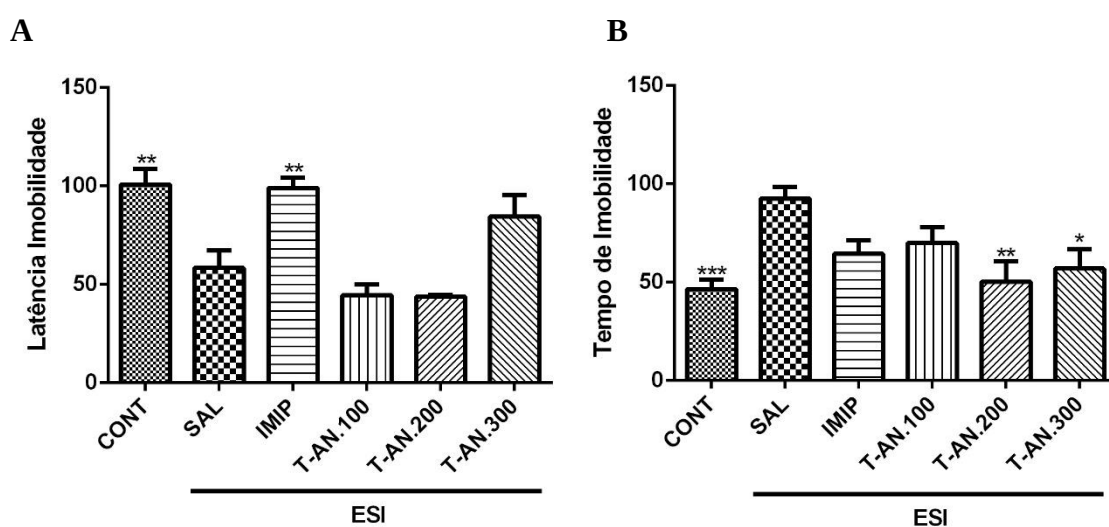


Figura 12 - A) Latência para Imobilidade. B) Tempo de Imobilidade. ANOVA "one way" seguido pelo teste de *post hoc* de Dunnett. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ em relação ao ESI. (n:8).

Campo aberto

Buscando observar alterações na ambulação dos animais e na capacidade de exploração foram analisados o número de cruzamentos, percentual de permanência no centro e número de rearings. Para este último parâmetro se encontrou diferença estatisticamente significativa apenas entre os grupos tratados nas doses de 100 e 200 mg/kg comparados com o grupo ESI [F(5,42)=10,8, $p<0,0001$](Figura 12-A).

Para o número de cruzamentos (Figura 12-B) apenas os grupos controle e tratamento 100 mg tiveram diferença estatística significativa [F(5,42)=8,0, $p<0,0001$]. Por sua vez o tempo no centro, mensurado em percentual, (Figura 12-C) demonstrou que os grupos controle, imipramina e trans-anetol (100mg/kg) promoveram uma maior permanência dos animais nesta área, com significância estatística, quando comparados ao grupo estresse [F(5,42)=6,8, $p<0,0001$].

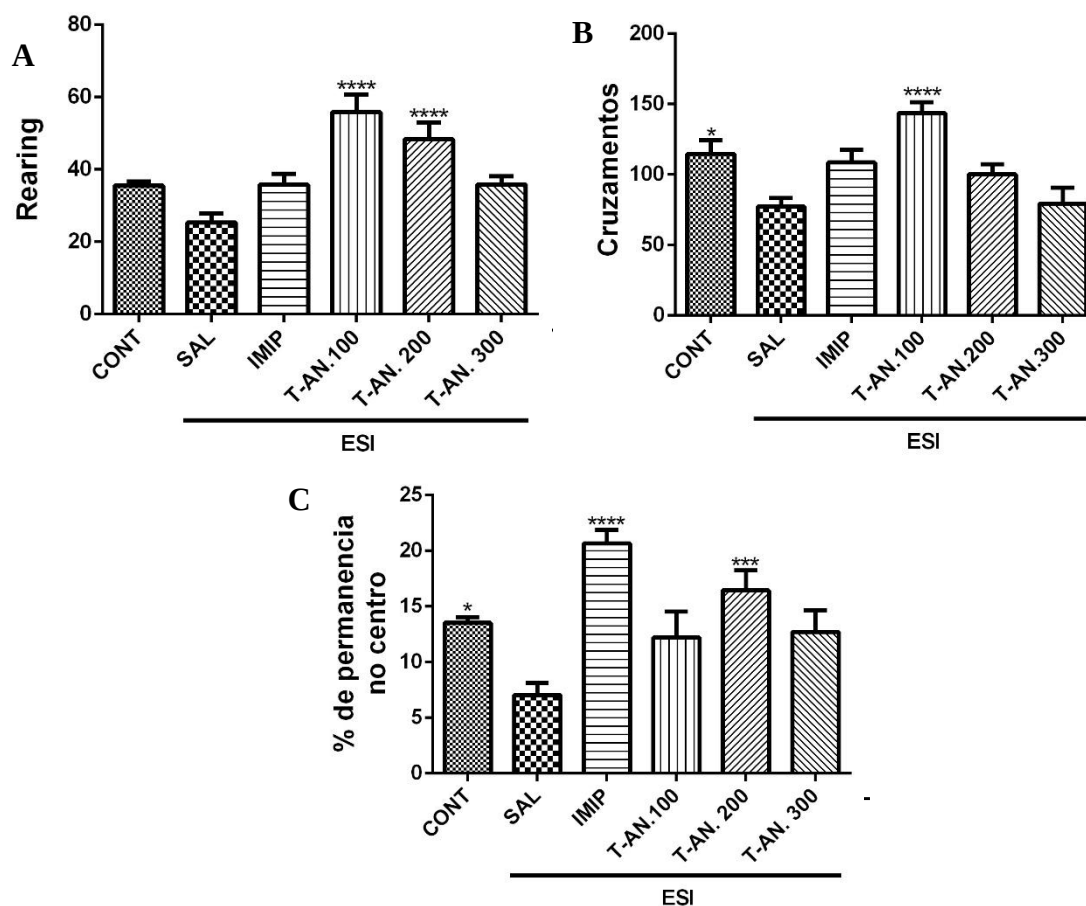


Figura 13 - A) Número de Rearings. B) Número de Cruzamentos. C) Percentual de Permanência no Centro. ANOVA "one way" seguido pelo teste *post hoc* de Dunnett. * $p<0,05$; ** $p<0,01$; **** $p<0,0001$ em relação ao ESI. (n:8).

Neuroquímico

Na busca de observar as alterações bioquímicas que o protocolo e nossa substância teste possam causar no cérebro dos animais foi realizado o estudo neuroquímico do hipocampo dos camundongos. Foram quantificados os níveis de cortisol, triptofano, serotonina (5-HT), ácido 5-hidroxi-indolacético, dopamina (DOPA) e ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC).

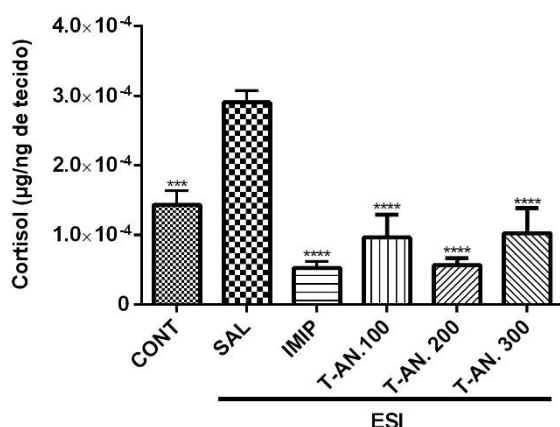


Figura 14 - Concentração de cortisol no hipocampo. ANOVA "one way" seguido pelo teste *post hoc* de Dunnett. *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ em relação ao ESI (n:8).

Os níveis de cortisol (Figura 13) encontrados foram extremamente elevados no grupo ESI, estatística significativa em relação aos demais grupos [$F(5,42)=14,3$, $p < 0,0001$].

Na via metabólica relacionada com a via serotoninérgica (triptofano, 5-HT, 5-HIAA), verificou-se que os níveis de triptofano (Figura 14) foram muito próximos entre os grupos [$F(5,42)=4,7$, $p = 0,0016$]. A quantificação dos níveis

de serotonina (Figura 15) também apresentou diferença estatística do grupo ESI com os grupos imipramina, trans-anetol 100mg e 200 mg/kg [$F(5,42)=14,4$, $p < 0,0001$]. O metabólito, 5-HIAA (Figura 16) apresentou um resultado estatisticamente significativo de todos os grupos em relação ao estresse [$F(5,38)=15,3$, $p < 0,0001$].

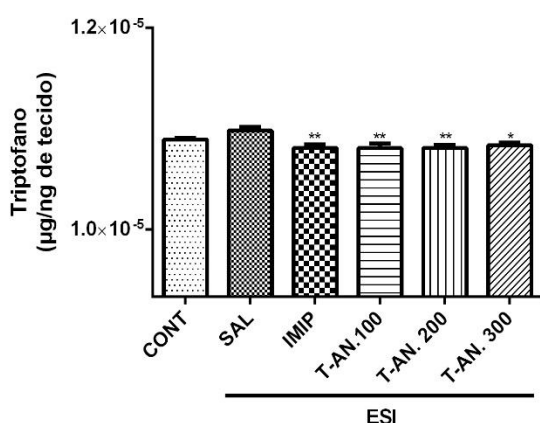


Figura 16- Concentração de Triptofano no hipocampo. ANOVA "one way" seguido pelo teste *post hoc* de Dunnett. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ em relação ao ESI (n:8).

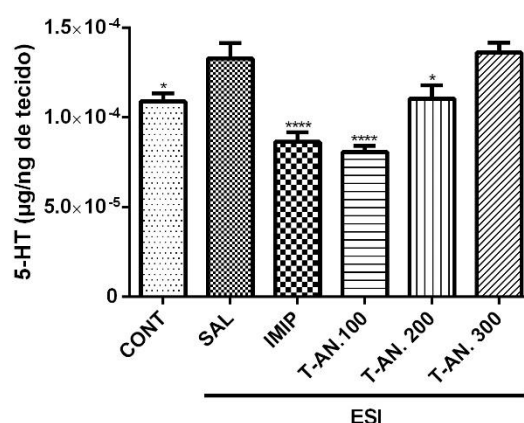


Figura 15 - Concentração de Serotonina no hipocampo. ANOVA "one way" seguido pelo teste *post hoc* de Dunnett. * $p < 0,05$; **** $p < 0,0001$ em relação ao ESI (n:8).

Buscando compreender melhor esta via, elaborou-se uma proporção entre os metabólitos. Foi feita a relação entre a formação de serotonina e presença de triptofano (Figura 17) [$F(5, 36)=16,75$, $p<0.0001$] sendo que o grupo ESI diferiu estatisticamente dos grupos controle, imipramina, trans-anetol 100 e 200 mg/kg. A relação da degradação da serotonina em seu metabolito 5-HIAA (Figura 18) [$F(5, 39)= 40,48$, $p<0.0001$], observou-se que o grupo ESI obteve significância estatística em relação ao grupo controle e trans-anetol nas três doses.

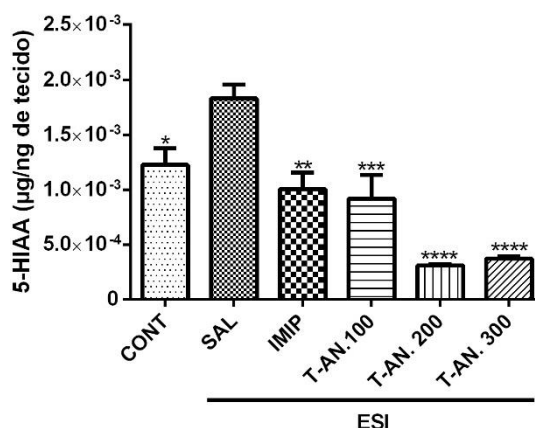


Figura 17 - Concentração de Ácido 5-hidroxi-indolacético. ANOVA "one way" seguido pelo teste *post hoc* de Dunnett. * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$; **** $p<0,0001$ (n:8-7).

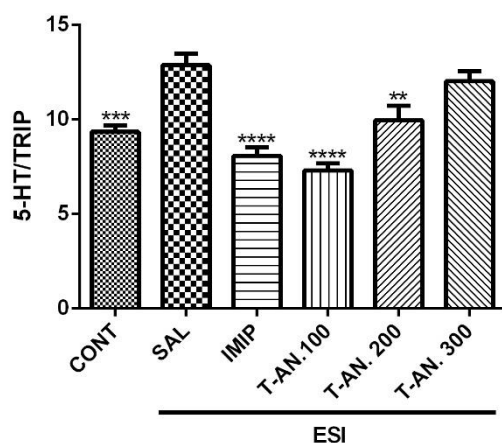


Figura 18 - Proporção 5-HT/Triptofano. ANOVA "one way" seguido pelo teste *post hoc* de Dunnett. ** $p<0,01$; *** $p<0,001$; **** $p<0,0001$ em relação ao ESI (n:7).

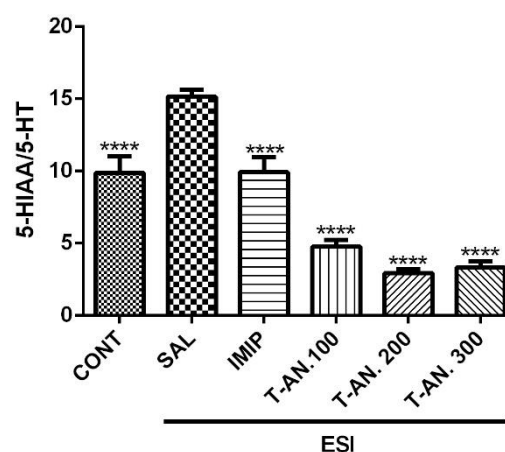


Figura 19 - Proporção 5-HIAA/5-HT. ANOVA "one way" seguido pelo teste *post hoc* de Dunnett. ** $p<0,01$, **** $p<0,0002$ em relação ao ESI (n:7).

A investigação da vida dopaminérgica também foi realizada, sendo determinado a concentração de dopamina (Figura 19-A) [$F(5, 36)= 18,6$, $p<0,0001$], observou-se diferença estatística entre o grupo ESI e o grupo controle. Em relação ao metabólito da dopamina, o DOPAC (Figura 19-B) [$F(5, 36)=5,5$, $p=0,0007$], verificou-se diferença entre os grupos trans-anetol 200 e 300 em relação ao ESI. Ao realizar-se a investigação da proporção (Figura 20) da degradação de dopamina em DOPAC [$F(5, 36)=20,1$, $p<0.0001$] os grupos controle, imipramina e trans-anetol 200mg/kg apresentaram significância estatística em comparação ao grupo que recebeu os estressores (ESI).

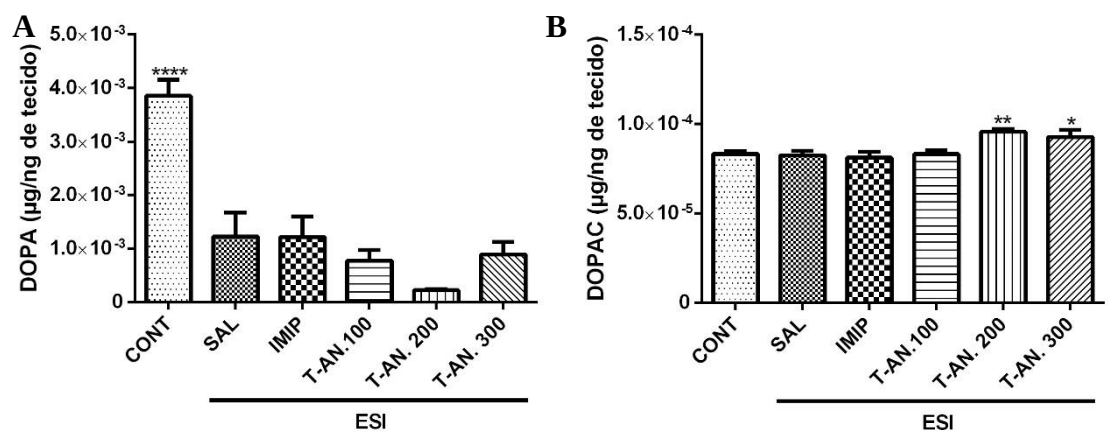


Figura 20 - A) Concentração de Dopamina no hipocampo. B) Concentração DOPAC no hipocampo. ANOVA "one way" seguido pelo teste *post hoc* de Dunnett. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$ em relação ao ESI (n:7).

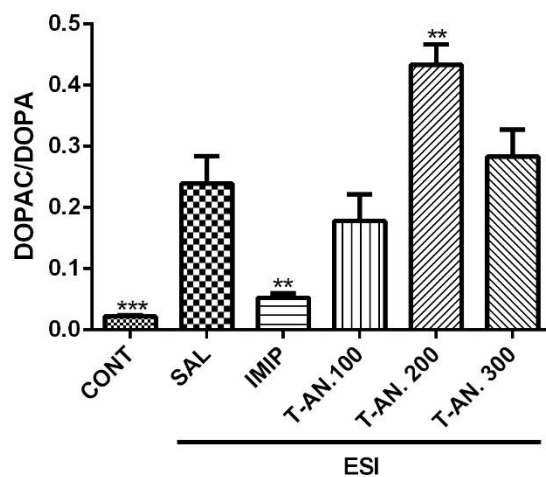


Figura 21 - Proporção DOPAC/DOPA. ANOVA "one way" seguido pelo teste *post hoc* de Dunnett. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ em relação ao ESI (n:7).

DISCUSSÃO

O transtorno depressivo maior é um distúrbio comportamental, associado a diversos fatores principalmente a eventos estressantes ao longo da vida. Os modelos não-clínicos buscam mimetizar este transtorno em animais avaliando mudanças comportamentais e fisiológicas compatíveis com a depressão (Chandrasekhar, Ramya, Navya, Kumar, Anilakumar, 2017).

Este trabalho buscou por meio do estresse subcrônico imprevisível, a indução do comportamento do tipo depressivo em camundongos fêmeas e investigar se o trans-anetol poderia reverter este efeito.

Como parâmetro inicial foi avaliada a evolução ponderal dos animais durante o protocolo experimental. A variação do peso é um parâmetro importante pois pacientes depressivos apresentam alterações de ganho ou perda de peso de forma significativa (Takasande et al., 2013). No nosso trabalho os animais que receberam o ESI e o grupo sem estresse (controle) apresentaram aumento do percentual de peso até o sétimo dia, momento em que iniciou-se a administração dos tratamentos, e ao final do protocolo se pode identificar que os grupos estresse e trans-anetol (200-300mg/kg) tiveram redução de percentual. O ganho reduzido de peso pelo grupo ESI em relação aos demais seria um indício de que o protocolo foi efetivo em promover alterações fisiológicas nos animais, essa redução já foi relatada em outros trabalhos que utilizaram métodos mais longos de estresse (4-6 semanas) (Gong et al., 2018; Takasande et al., 2013). Outro ponto importante foi que os animais tratados com imipramina não tiveram perda de peso, o que indicaria que o tratamento padrão consegue ser efetivo em apenas sete dias de aplicação em amenizar os efeitos fisiológicos dos estressores sobre os animais.

O tratamento com trans-anetol por sua vez promoveu a perda de peso nas duas maiores doses, uma justificativa para esse resultado é que ele possui uma ação moduladora sobre adipócitos, promovendo a atividade mitocondrial em adipócitos brancos e aumento da proliferação de adipócitos marrons. Esta ação resulta em elevação do processo de lipólise nos animais e redução de peso (Kang, Mukherjee, Min, Kang & Yun, 2018).

Buscando avaliar a presença do comportamento do tipo depressivo induzido pelo ESI, foram utilizados os testes de borrifagem da sacarose e de suspensão da cauda. Na borrifagem da sacarose se avalia a latência e o tempo total de autocuidado, com o objetivo de investigar o comportamento de anedonia nos animais. Animais com comportamento

do tipo depressivo, apresentam redução do tempo de autocuidado, porém este pode aumentar com a administração de antidepressivos (Moretti et al., 2012; Rosa et al., 2014).

Foi encontrado que o grupo estresse apresentou um maior tempo de latência para o autocuidado, comparado aos demais. O que indica que os animais levam mais tempo para iniciar o comportamento de autocuidado, um sinal de redução do comportamento anedônico. Este resultado é semelhante a outras pesquisas que utilizaram o CUMS o que corrobora que o estresse aplicado de forma sistemática pode levar a alterações comportamentais (Li et al., 2018; Takasande et al., 2013).

O tempo de autocuidado, segundo parâmetro analisado no teste, mostrou que o grupo estressado teve um tempo menor, indicando mais uma vez que o protocolo conseguiu reduzir o comportamento de anedonia, apenas com 14 dias de indução. Moretti e colaboradores (2012) também conseguiu induzir essa redução do tempo de autolimpeza no grupo estresse com um protocolo de 14 dias, mostrando-se então um protocolo reprodutível. Outros trabalhos com períodos mais longos de experimentação e indução por meio da aplicação crônica de cortisol também tiveram o mesmo resultado na diferenciação do tempo entre o grupo controle e estresse (Pessarico et al., 2016; Zhang et al., 2016).

O trans-anetol nesse teste apresentou um ótimo desempenho, tanto para a redução da latência quanto para aumentar o tempo de autocuidado, em destaque para as doses de 200mg/kg e 300mg/kg. Na latência o resultado inclusive se equiparou ao da imipramina na dose de 300mg, o que pode indicar uma ação antidepressiva neste teste.

A ação de derivados do eugenol sobre o teste de borrifagem da sacarose já foi analisada em outros trabalhos. Cavalcante (2018) encontrou que o metileugenol em doses de 25mg/kg e 50 mg/kg conseguiram reduzir a latência e aumentar o tempo de autocuidado. Araújo (2018) por sua vez investigou a ação do orto-eugenol também encontrou resultados promissores, com redução da latência em todas as doses se equiparando a imipramina e aumento do tempo do autocuidado nas doses de 50 mg/kg e 100mg/kg. Em ambos os estudos se utilizou a metodologia da indução do comportamento depressivo com aplicação aguda de dexametasona, um glicocorticoide sintético.

Outro teste comportamental utilizado foi a suspensão da cauda. Este teste é um dos principais na pesquisa não-clínica na triagem de drogas antidepressivas por ser sensível e específico para a maioria dos antidepressivos. O fundamento do teste baseia-se em colocar o animal em uma situação de perigo inescapável e avaliar o comportamento de imobilidade. Essa imobilidade corresponde a uma desistência que é descrita em estados

depressivos. A imobilidade por sua vez pode ser diminuída com a aplicação de antidepressivos (Holmes, 2003; Steru, Chermat, Thierry & Simon, 1985; Willner & Mitchell, 2002).

O tempo de imobilidade e a latência apresentaram diferença entre o grupo estresse e controle o que associado ao resultado da borrifagem da sacarose consolida que o protocolo de 14 dias consegue induzir o comportamento do tipo depressivo. Os trabalhos de Neis e colaboradores (2016), Moretti et al (2012) e Manosso et al (2016) encontraram resultados semelhantes, com aumento do tempo de imobilidade do grupo estresse em relação ao grupo controle. Nesses trabalhos foram utilizados estressores por um período semelhante ao da nossa pesquisa (quatorze dias), diferenciando a quantidade e intensidade de estressores, o que gera uma maior credibilidade da capacidade do nosso modelo de induzir o comportamento do tipo depressivo. Além de conseguir inibir o mesmo quando um grupo é tratado com antidepressivo como a fluoxetina.

As doses do trans-anetol que apresentaram melhor resultado foram de 200mg/kg e 300mg/kg quando analisado o tempo de imobilidade, sendo melhores inclusive que a droga padrão – imipramina.

A ação de substâncias naturais sobre o presente teste em protocolos de estresse crônico vem sendo uma importante linha de pesquisa no desenvolvimento de protótipos de fármacos. A exemplo temos os terpenos (timol, mentona), classe de substâncias encontradas em óleos essenciais de algumas plantas aromáticas da família Lamiaceae, que puderam reduzir o tempo de imobilidade de camundongos machos, ao serem submetidos a protocolos de CUMS, ambos com resultados muito próximos estatisticamente ao da fluoxetina (Deng et al., 2015; Xue et al., 2015). Outros constituintes como polifenóis também apresentam ação antidepressiva quando analisados por este teste, utilizando o CUMS (5 semanas) (Liu et al., 2013). Em um trabalho realizado por Wei-Wei e colaboradores (2014), encontraram uma promissora atividade antidepressiva do óleo essencial da *Perilla frutescens* (L.) da família lamiaceae, sendo capaz de reduzir o tempo de imobilidade de camundongos machos submetidos a 6 semanas de CUMS, com resultado semelhante estatisticamente ao da droga padrão (fluoxetina).

Esse efeito antidepressivo também já pode ser encontrado no eugenol e alguns de seus derivados (metileugenol, orto-eugenol), com redução do tempo de imobilidade e nos derivados ainda aumentaram o tempo da latência nas concentrações de 50mg/kg (metileugenol), 50mg/kg e 75mg/kg (orto-eugenol). Com base nesses resultados é

possível observar que essa linha de constituintes apresenta potencial para o desenvolvimento de fármacos com ação antidepressiva (Araújo, 2018; Cavalcante, 2018).

Apesar do trans-anetol não apresentar diferença estatística significativa na latência desse teste (suspensão da cauda) é importante destacar a importância desse parâmetro pouco analisado nas pesquisas não-clínicas, por contribuírem na compreensão do efeito de protocolos de indução do comportamento depressivo e da ação de antidepressivos neste teste (Castagné, Porsolt & Moser, 2009)

O campo aberto foi último teste comportamental empregado, largamente usado para avaliação da atividade locomotora espontânea e alterações comportamentais em roedores (Choleris, Thomas, Kavaliers & Prato, 2001). Os parâmetros do campo aberto são importantes para a pesquisa não-clínica por ajudar a investigar se as substâncias apresentam algum efeito sobre a ambulação dos animais assim como se reduzem a atividade exploratória e interesse, ambas ação instintivas em animais em condições normais que quando reduzidas indicariam diminuição da motivação dos mesmo, essa apatia poder ser translacionada para humanos como o sentimento de desânimo, comum em pacientes com depressão (Hu et al., 2010; Hu et al., 2017). Em nosso estudo os parâmetros analisados foram: número de rearing (levantamentos), número de cruzamentos e permanência no centro.

O rearing apresentou aumento significativo nas doses de 100mg/kg e 200mg/kg do trans-anetol quando comparados com o grupo estresse, no número de cruzamentos apenas a dose de 100mg/kg conseguiu aumentar de forma significativa em relação ao grupo estresse, por fim a permanência no centro foi maior na dose de 200mg/kg se aproximando inclusive do efeito da imipramina.

Wei-Wei et al. (2014) ao testar o óleo essencial de *Perilla frutescens* (L.), também encontrou um aumento do rearing e cruzamento dos animais nos grupos tratados com a dose de 6mg/kg, e no grupo tratado com fluoxetina (10mg/kg), ambos diferiram do grupo estresse, o que indicaria uma provável melhora do comportamento exploratório dos animais provocada pelos tratamentos utilizados. Liu et al. (2013) encontrou após cinco semanas de protocolo de CUMS aumento com significância estatística do número de cruzamentos e rearings em camundongos machos tratados com polifenóis. Testes com honokiol, uma lignana presente na *Magnolia officinalis* obteve resultados semelhantes aos nossos em relação a um aumento dos cruzamentos e rearings quando comparados com o grupo CUMS (Wang et al., 2018) o mesmo se obteve nos estudos de Xue et al. (2015) na avaliação da ação antidepressiva da mentona, com uso de protocolo de sete semanas de

estresse. Estes trabalhos reforçam a ação de produtos naturais frente ao protocolo de estresse de conseguirem aumentar o processo de investigação que se apresenta reduzido em animais estressados tratados com salina.

Um dado que deve ser destacado é o fato de que em nosso protocolo o número de cruzamentos apresentou redução significativamente estatística entre o grupo estresse e controle, com redução desse parâmetro no grupo ESI. Esse resultado não foi obtido nos trabalhos que utilizaram o ESI pelo mesmo período (14 dias) o que indica que as adaptações utilizados em nosso trabalho conseguiram promover alterações comportamentais significativas nos animais que puderam ser avaliadas pelo teste do campo aberto (Manosso et al., 2016; Moretti et al., 2012; Neis et al., 2016).

Sobre o percentual de tempo no centro, Huang et al. (2018) encontrou resultado semelhante, como a diferença estatística entre o grupo controle e estresse (redução do tempo no centro) e aumento do tempo no centro com grupo tratado com vitamina E, seu estudo utilizou camundongos fêmeas, em CUMS de trinta e seis dias de duração. Gazal et al. (2014) por sua vez ao testar a ação do extrato aquoso de folhas de *Cecropia pachystachya* em um protocolo de quatorze dias de estresse em camundongos machos, não obteve aumento deste parâmetro para o grupo tratamento com o extrato, mas encontrou diferença entre o grupo estressado e não estressado, com redução do tempo no centro do grupo estresse.

Sobre a ação de derivados do eugenol sobre o campo aberto, já se tem documentado que o metileugenol promove um aumento no número de cruzamentos e do tempo que camundongos fêmeas passam no centro, principalmente nas doses de 25 mg/kg e 50 mg/kg (Cavalcante, 2018). O orto-eugenol por sua vez apresenta apenas aumento do número de cruzamentos nas doses de 50mg/kg e 75mg/kg em relação ao grupo controle negativo (dexametasona) (Araújo, 2018). Esses resultados podem indicar que variações no protocolo e na estrutura química do derivado podem levar a modificações na sua resposta comportamental, porém ainda demonstram que o eugenol e seus derivados possuem uma potencial ação sobre o sistema nervoso central, principalmente revertendo os comportamentos do tipo depressivo em roedores.

A partir dos nossos resultados comportamentais, foi realizado uma análise neuroquímica para compreender se o protocolo também induziu alterações fisiológicas significativas.

O cortisol, principal hormônio relacionado com o estresse e que costuma apresentar elevado em pacientes com transtorno depressivo maior, foi avaliado para

identificar se o protocolo poderia induzir alterações nos seus níveis. Encontramos que o grupo ESI teve um aumento tão significativo estatisticamente dos níveis de cortisol que se diferenciou de todos os demais grupos do estudo.

O trabalho de Moretti et al. (2012) que serviu de base para o protocolo não encontrou alterações estatisticamente diferente entre os grupos dos níveis séricos de cortisol, o que corrobora com nossas conjecturas baseadas nas respostas comportamentais, que nosso protocolo modificado conseguiu gerar alterações bioquímicas nos camundongos. Chandrasekhar et al. (2017) similarmente encontrara níveis de cortisol elevados no grupo estresse que foram reduzidos de forma significativa no grupo tratado com imipramina na dose de 10 mg/kg respectivamente. Trabalhos de Taksand et al. (2013) e Wang et al. (2018) encontraram o mesmo padrão entre grupo não estressado, CUMS e CUMS+fluoxetina (10 mg/kg), o que reforça uma ação dos antidepressivos para a redução dos níveis de cortisol. É importante destacar que os trabalhos citados tiveram protocolos de duração maior do que o nosso, variando de três a seis semanas de estresse, demonstrando que nossas adaptações a metodologia foram tão eficazes quanto as demais para provocar variações nos níveis deste hormônio.

O trans-anetol em todas as três doses conseguiram reduzir a concentração do cortisol, de forma semelhante a imipramina. O extrato de hidro alcóolico de *Terminalia catappa* L, conseguiu de forma semelhante reduzir esses níveis em suas três concentrações (Chandrasekhar, Ramya, Navya, Kumar & Anilakumar, 2017). Honiokiol (lignana) por sua vez também teve a capacidade de reduzir a concentração sérica de cortisol, sendo a dose de 8 mg/kg com efeito semelhante estatisticamente a fluoxetina 10mg/kg em relação ao grupo estressado (Wang et al., 2018). O que reforça que produtos naturais tem capacidade de provocar alterações fisiológicas semelhantes aos medicamentos amplamente utilizados em metodologias não-clínicas de indução da depressão.

Com base no que foi exposto na fundamentação, a teoria das monoaminas foi uma das iniciais para tentar elucidar a fisiopatologia da depressão, com base nela, buscamos também investigar a concentração de alguns neurotransmissores, precursores e derivados para tentar elucidar as prováveis vias afetadas pelo protocolo e como a trans-anetol poderia interferir nelas para promover seu efeito comportamental. Levando em conta as diferentes vias abordamos na quantificação neuroquímica as vias serotoninérgicas e dopaminérgicas.

A primeira via analisada foi a serotoninérgica, nela analisamos o triptofano, serotonina e o 5-HIAA. O triptofano é o precursor da serotonina, no estudo fizemos sua quantificação no hipocampo e encontramos que os grupos estresse e controle não diferiram entre si, porém os demais tratamentos (imipramina e trans-anetol) tiveram uma redução significativa da sua concentração. A serotonina por sua vez teve seus níveis elevados no grupo estresse e trans-anetol na dose de 300mg/kg. Entretanto na concentração do seu derivado o 5-HIAA o grupo ESI se manteve com maior concentração, sendo diferente estatisticamente dos demais grupos do estudo.

Analisados de forma individual é possível observar que os níveis de triptofano não diferiram entre o grupo controle e estresse o que difere de outros trabalhos como o de Han et al. (2019) que encontrou diferença significativa entre as concentrações de triptofano de ratos machos que passaram por CUMS de vinte e sete dias, onde no seu estudo de padronização o grupo estresse obteve uma redução dos níveis de triptofano no hipocampo. Outras pesquisas que também utilizaram o CUMS em ratos por períodos de três a cinco semanas também encontraram uma redução do nível de triptofano no grupo estresse e reversão desses níveis com a administração de fluoxetina (Xing, Zhang, Xing, Qu & Zhang, 2019; Zhu et al., 2015).

A serotonina também apresentou resultados que diferem da literatura, Deng et al. (2015) ao utilizar camundongos machos em protocolo de seis semanas, obteve redução dos seus níveis ao comparar com o grupo controle, entretanto o grupo tratado com timol teve nível semelhante ao grupo não estressado, o que também encontramos com o trans-anetol na concentração de 200mg/kg. Resultado semelhante foi encontrado por Xue et al. (2015) que o grupo CUMS reduziu significativamente a concentração de 5-HT porém o mirtenol nas doses de 15mg/kg e 30 mg/kg, conseguiram reverter o efeito do protocolo de sete semanas e ter valores próximos ao do grupo não estressado. O fato de nosso trabalho apresentar níveis de serotonina, que diferem das demais pesquisas não-clínicas que utilizaram o CUMS (Chandrasekhar et al., 2017; Qiu, Zhong, Mao & Huang, 2013; Vancassel et al., 2008) podem sugerir que apenas protocolos mais longos, talvez de seis semanas sejam necessários para reduzir os níveis da 5-HT no hipocampo.

O ácido 5-hidroxi-indolacético, produto da degradação da serotonina apresentou resultado semelhante a literatura, em que o estresse induz a um aumento da sua produção como encontrado por Han et al. (2019) e Gao et al. (2013). O crescimento dos níveis do 5-HIAA promovido pelo estresse pode ser justificado pelo fato de que o CUMS induz a

atividade da enzima MAO, responsável pela degradação de neurotransmissores como 5-HT e DA (Song et al., 2018).

Buscando avaliar as alterações provocadas na via serotoninérgica foram feitas as proporções entre serotonina/triptofano e 5-HIAA/5-HT. Na primeira avaliação se encontrou que o grupo estresse teve um aumento da proporção de serotonina em relação ao triptofano. Para os grupos imipramina e trans-anetol nas concentrações de 100mg/kg e 200mg/kg essa proporção foi reduzida, indicando uma menor produção de serotonina em relação a quantidade de triptofano. Para observar a degradação da serotonina avaliou-se a proporção 5-HIAA/5-HT e mostrou que o grupo ESI foi diferente estatisticamente de todos os grupos, indicando um aumento da concentração do ácido 5-hidroxi-indolacético em relação a concentração de serotonina. Esse dado pode sugerir que apesar de ocorrer um aumento da concentração de serotonina o protocolo de estresse induz a uma maior degradação da mesma o que é encontrado em outras pesquisas (Gao, Cui, Yu & Wnag, Zhang, 2013; Qiu et al., 2013; Song et al., 2018) assim esses resultados poderiam indicar que as sinapses estariam em processo de adaptação, buscando repor a serotonina que está sendo degradada de forma intensa. O grupo tratado com imipramina teve sua proporção reduzida tanto na produção quanto degradação, o que poderia indicar que as sinapses dos animais ainda estariam em processo de adaptação ao medicamento, visto que a sua administração foi de sete dias no protocolo. A imipramina é um antidepressivo tricíclico é responsável por essa inibição da recaptação de neurotransmissores, resultando em sua redução da degradação e aumento dos níveis de sinapse, o que reduziria a necessidade de sua produção (Ono et al., 2012).

O trans-anetol diante deste parâmetro, se mostrou promissor, principalmente na redução da proporção de 5-HIAA/5-HT o que indica uma inibição do processo de degradação da serotonina pela substância, o que torna possível projetar que o mesmo possa atuar sobre diversos alvos como as proteínas de membrana recaptadoras de serotonina ou da monoaminoxidase.

A segunda via analisada foi a dopaminérgica, na quantificação neuroquímica, encontramos que os níveis de dopamina diferenciaram estatisticamente apenas do grupo não estressado, todos os demais tiveram os níveis deste neurotransmissor reduzidos eficientemente. Sobre o ácido 3,4-di-hidroxifenilacético (DOPAC), apenas o trans-anetol nas doses de 200mg/kg e 300mg/kg tiveram diferença significativa do grupo estresse, o que poderia indicar que para essas doses o trans-anetol poderia estar promovendo o aumento da concentração de DOPAC.

Essa redução da concentração de dopamina nos grupos estresse é corroborada por diversos trabalhos que utilizam o estresse como base para a indução do comportamento do tipo depressivo, o que demonstra que essa metodologia pode ser eficaz para induzir mudanças comportamentais e fisiológicas (Qiu et al., 2013; Song et al., 2018; Xing, Zhang, Xing, Qu & Zhang, 2019).

Assim como na via serotoninérgica, realizou-se a proporção de metabolito e neurotransmissor na via dopaminérgica, comparando a concentração de ácido 3,4-dihidroxifenilacético pelo nível de dopamina. Nesta proporção se encontrou que o grupo tratado com imipramina possui uma degradação estatisticamente reduzida da dopamina em relação aos animais estressados sem tratamento, contudo o trans-anetol na dose 200 mg/kg apresenta um índice superior ao ESI o que poderia indicar que ele estaria promovendo uma maior formação do metabolito. Song et al. (2018) encontrou na relação DOPAC/DOPA que camundongos machos, em CUMS de seis semanas tem uma redução nessa relação quando tratados com fluoxetina, o que seria semelhante ao nosso resultado com os animais tratados com imipramina. O mecanismo pelo qual o trans-anetol estaria promovendo esse aumento da degradação é incerto devido o mesmo reduzir este efeito sobre a serotonina, logo não estariam exercendo seus efeitos sobre enzimas de uma mesma via como a MAO responsável pela degradação de ambos os neurotransmissores (Bortolato, Chen & Shih, 2010).

A partir do que foi exposto se torna necessário investigar o mecanismo de ação pelo qual o trans-anetol estaria exercendo seus efeitos comportamentais, além de investigar outros neurotransmissores que podem estar relacionados com o comportamento do tipo depressivo como noradrenalina e glutamato, assim como outros mediadores relacionados como citocinas pró-inflamatórias, investigar a redução da produção de radicais livres e a ação sobre a enzima MAO.

Ficou claro que o fenilpropanóide trans-anetol consegue impedir a formação do comportamento do tipo depressivo em um protocolo que utiliza o estresse e apresentou desempenho semelhante a outros trabalhos com maior tempo de duração de estresse. Tornando assim, um achado importante para a pesquisa e desenvolvimento de fármacos com protocolos mais curtos e que não percam sua efetividade.

CONCLUSÃO

Podemos concluir que o protocolo de estresse subcrônico imprevisível consegue ser efetivo na indução do comportamento do tipo depressivo em camundongos fêmeas, entretanto algumas alterações fisiológicas (redução serotonina) não pode ser encontrada, o que pode sugerir que o presente protocolo conseguiriam simular o início do processo do comportamento depressivo nos animais.

O trans-anetol no processo de ESI na dose de 200mg/kg apresenta um melhor desempenho comportamental, além de reduzir de forma efetiva os níveis de cortisol e inibir a degradação de serotonina.

REFERÊNCIAS

Aazza, S., Lyoussi, B., & Miguel, M. G. (2011). Antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of some commercial essential oils and their major compounds. *Molecules*, 16(9), 7672–7690.

Adebesin, A., Adeoluwa, O. A., Eduviere, A. T., & Umukoro, S. (2017). Methyl jasmonate attenuated lipopolysaccharide-induced depressive-like behaviour in mice. *Journal of Psychiatric Research*, 94, 29–35.

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

Almeida, R. F. de, Ganzella, M., Machado, D. G., Loureiro, S. O., Leffa, D., Quincozes-Santos, A., ... Souza, D. O. (2017). Olfactory bulbectomy in mice triggers transient and long-lasting behavioral impairments and biochemical hippocampal disturbances. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 76, 1–11.

Almeida, R. N., De Fátima Agra, M., Maior, F. N. S., & De Sousa, D. P. (2011). Essential oils and their constituents: Anticonvulsant activity. *Molecules*, 16(3), 2726–2742.

Almeida, R. N., Oliveira, T. M. L. (2006). *Triagem farmacológica comportamental. Psicofarmacologia: fundamentos práticos*, 1ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 131-137.

American Psychiatric Association. (2014). *DSM-V*. Porto Alegre: Artmed, p. 948.

Araújo, A. N. V. (2018). *Investigação Da Atividade Antidepressiva Do Ortoeugenol Em Modelos Comportamentais De Depressão Induzidos Por Dexametasona*. Dissertação – Universidade Federal da Paraíba, 84p.

- Aydemir, D. H., Çifci, G., Aviyente, V., & Boşgelmez-Tinaz, G. (2018). Quorum-sensing inhibitor potential of trans-anethole against *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Applied Microbiology*, 125(3), 731–739.
- Bai, Y., Song, L., Dai, G., Xu, M., Zhu, L., Zhang, W., ... Ju, W. (2018). Antidepressant effects of magnolol in a mouse model of depression induced by chronic corticosterone injection. *Steroids*, 135(155), 73–78.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D. & Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils – a review. *Food and Chemical Toxicology*, 46, 446–475.
- Barber, V. P., Newby, J. J. (2013). Jet-Cooled Fluorescence Spectroscopy of a Natural Product: Anethole. *Journal of Physical Chem. A*, 117, 12831–12841.
- Bartoňková, I., & Dvořák, Z. (2018). Essential oils of culinary herbs and spices display agonist and antagonist activities at human aryl hydrocarbon receptor AhR. *Food and Chemical Toxicology*, 111, 374–384.
- Basso, A. M. et al. (2009). Behavioral profile of P2X7 receptor knockout mice in animal models of depression and anxiety: Relevance for neuropsychiatric disorders. *Behavior Brain Research*, 198, 83-90.
- Batista, W. S., Ornelas, F. H. (2013). Exercício físico e depressão: relação entre exercício físico e o grau de depressão. *Revista Brasileira de Prescrição e Fisiologia do Exercício*, 7(42), 474-482.
- Belujon, P., & Grace, A. A. (2014). Restoring mood balance in depression: Ketamine reverses deficit in dopamine-dependent synaptic plasticity. *Biological Psychiatry*, 76(12), 927–936.
- Beurel, E., Harrington, L. E., & Joep, R. S. (2013). Inflammatory T helper 17 cells promote depression-like behavior in mice. *Biological Psychiatry*, 73(7), 622–630.

Borah, L., Lahkar, M., & Dasgupta, S. (2018). Study of the antidepressant activity of folic acid and vitamin-D on reserpine induced depression in mice. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 11(2), 2–6.

Bortolato, M., Chen, K., Shih, J. C. (2010). *The Degradation of Serotonin: Role of MAO*. Handbook of Behavioral Neurobiology of Serotonin, 203-217.

Carneiro, C. A. (2017). *Padronização de um modelo de estresse subcrônico imprevisível, para indução da depressão*. Trabalho de conclusão de curso – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 60p.

Cavalcante, I. L. (2018). *Avaliação Comportamental Não Clínica Do Metileugenol Em Modelo De Depressão Induzida Por Dexametasona Com Fêmeas*. Dissertação – Universidade Federal da Paraíba, 90 p.

Cavalcanti, J. M., Henrique Leal-Cardoso, J., Leite Diniz, L. R., Gomes Portella, V., Oliveira Costa, C., Barreto Medeiros Linard, C. F., ... Coelho-De-Souza, A. N. (2012). The essential oil of *Croton zehntneri* and trans-anethole improves cutaneous wound healing. *Journal of Ethnopharmacology*, 144(2), 240–247.

Chan, J. N.-M., Lee, J. C.-D., Lee, S. S. P., Hui, K. K. Y., Chan, A. H. L., Fung, T. K.-H., ... Ngai, S. P.-C. (2017). Interaction Effect of Social Isolation and High Dose Corticosteroid on Neurogenesis and Emotional Behavior. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 11, 1–10.

Chandrasekhar, Y., Ramya, E. M., Navya, K., Kumar, P., Anilkumar, K. R. (2017). Antidepressant like effects of hydrolysable tannins of *Terminalia catappa* leaf extract via modulation of hippocampal plasticity and regulation of monoamine neurotransmitters subjected to chronic mild stress (CMS). *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 86, 414-425.

Choleris, E., Thomas, A. W., Kavaliers, M., & Prato, F. S. (2001). A detailed ethological analysis of the mouse open field test: effects of diazepam, chlordiazepoxide and an extremely low frequency pulsed magnetic field. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 25(3), 235-260.

Correia, K. M. L., & Borloti, E. (2011). *Mulher e Depressão : Uma Análise Comportamental-Contextual*. 3(19), 359–373.

Czéh, B., Fuchs, E., Wiborg, O., & Simon, M. (2016). Animal models of major depression and their clinical implications. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 64, 293–310.

DeLong, M.R. (2000). The basal ganglia. In: KANDEL, E.R.; SCHWARTZ, J.H.; JESSELL, T. M. (Ed.). *Principles of neural sciences*. New York: McGraw-Hill, p. 853-867.

DeLong, M.R. (2000). The basal ganglia. In: KANDEL, E.R.; SCHWARTZ, J.H.; JESSELL, T. M. (Ed.). *Principles of neural sciences*. New York: McGraw-Hill, p. 853-867.

Deng, X. et al. (2015). Geraniol produces antidepressant-like effects in a chronic unpredictable mild stress mice model. *Physiology & Behavior*. 152, 264- 271.

Deng, X., Li, H., Chen, J., Li, R., Qu, R., Fu, Q., Ma, S. (2015). Thymol produces antidepressant-like effect in a chronic unpredictable mild stress model of depression in mice. *Behavioral Brain Research*. 291, 12-19.

Dhingra, D., Bansal, Y. (2014). Antidepressant-like activity of beta-carotene in unstressed and chronic unpredictable mild stressed mice. *Journal of Functional Foods*, 7, 425-434.

Dias, A. M. (2009). A depressão em humanos e outras espécies. *Estudo e Pesquisas em Psicologia*, 3, 582-595.

Duan, D. et al (2015). Antidepressant-like effect of essential oil isolated from *Toona ciliata* Roem. var. *yunnanensis*. *Journal of natural medicines*, 69(2), 191-197.

Facundo, V. A. et al. (2016). Atividade Antioxidante e caracterização do óleo essencial das raízes de *Piper marginatum* Jacq. *Ciência e Natura, Santa Maria*, 38(3), 1504-1511.

Farinha, H. et al., (2013). Relação do tabagismo com ansiedade e depressão nos cuidados de saúde primários. *Revista Científica da Ordem dos Médicos*, 26(5), 523-530.

Fitsiou, E., Mitropoulou, G., Spyridopoulou, K., Tiptiri-Kourpeti, A., Vamvakias, M., Bardouki, H., ... Pappa, A. (2016). Phytochemical profile and evaluation of the biological activities of essential oils derived from the greek aromatic plant species *Ocimum basilicum*, *Mentha spicata*, *Pimpinella anisum* and *Fortunella margarita*. *Molecules*, 21(8), 1–15

Gao, S., Cui, Y., Yu, C., Wang, Q., Zhang, Y. (2013). Tetrandrine exerts antidepressant-like effects in animal models: Role of brain-derived neurotrophic factor. *Behavioural Brain Research*, 238, 79-85.

Gazal, M., Ortmann, C. F., Martins, F. A., Streck, E. M., Quevedo, J., Campos, A. M., Stefanello, F. M., Kaster, M. P., Ghisleni, G., Reginatto, F. H., Lencina, C. L. (2014). Antidepressant-like effects of aqueous extract from *Cecropia pachystachya* leaves in a mouse model of chronic unpredictable stress. *Brain Research Bulletin*, 108, 10-17.

Gong, H., Su, W. J., Cao, Z. Y., Lian, Y. J., Peng, W., Liu, Y. Z., ... Jiang, C. L. (2018). Hippocampal Mrp8/14 signaling plays a critical role in the manifestation of depressive-like behaviors in mice. *Journal of Neuroinflammation*, 15(1), 1–13.

Gracia-Rubio, I., Moscoso-Castro, M., Pozo, O. J., Marcos, J., Nadal, R., & Valverde, O. (2016). Maternal separation induces neuroinflammation and long-lasting emotional alterations in mice. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 65, 104–117.

Grover, S., Dutt, A., & Avasthi, A. (2010). An overview of Indian research in depression. *Indian journal of psychiatry*, 52(Suppl 1), S178-88.

Guedes, E. C. (2017). *Estudo não-clínico da atividade anticonvulsivante de um fenilpropanóide: avaliação comportamental e eletroencefalográfica*. Trabalho de conclusão de curso, Universidade Federal da Paraíba, 71p.

Han, X., Qin, Y., Zhu, Y., Zhang, X., Wang, N., Rang, Y., Zhai, X., Lu, Y. (2019). Development of an underivatized LC-MS/MS method for quantitation of 14 neurotransmitters in rat hippocampus, plasma and urine: Application to CUMS induced depression rats. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 174, 683-695.

Holanda, V. A. D., Medeiros, I. U., Asth, L., Guerrini, R., Calo', G., & Gavioli, E. C. (2016). Antidepressant activity of nociceptin/orphanin FQ receptor antagonists in the mouse learned helplessness. *Psychopharmacology*, 233(13), 2525–2532.

Holmes, P. V. (2003). Rodent models of depression: reexamining validity without anthropomorphic inference. *Critical ReviewsTM in Neurobiology*, 15(2)

Holzmann, I., Da Silva, L. M., Corrêa Da Silva, J. A., Steimbach, V. M. B., & De Souza, M. M. (2015). Antidepressant-like effect of quercetin in bulbectomized mice and involvement of the antioxidant defenses, and the glutamatergic and oxidonitrergic pathways. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 136, 55–63.

HU, C. et al.(2017) Re-evaluation of the interrelationships among the behavioral tests in rats exposed to chronic unpredictable mild stress. *PLOS ONE*, 20, 1-15.

HU, H et al. (2010) Behavioral and [F-18] fluorodeoxyglucose micro positron emission tomography imaging study in a rat chronic mild stress modelo of depression. *Neuroscience*, 169, 171-181.

Huang, X., Wu, H., Jiang, R., Sun, G., Shen, J., Ma, M., Ma, C., Zhang, S., Huang, Z., Wu, Q., Chen, G., Tao, W. (2018). The antidepressant effects of α -tocopherol are related to activation of autophagy via the AMPK/mTOR pathway. *European Journal of Pharmacology*, 833, 1-7.

Jastrzębska, J., Frankowska, M., Suder, A., Wydra, K., Nowak, E., Filip, M., & Przeglasiński, E. (2017). Effects of escitalopram and imipramine on cocaine reinforcement and drug-seeking behaviors in a rat model of depression. *Brain Research*, 1673, 30–41.

Jindal, A., Mahesh, R., & Bhatt, S. (2015). Etazolate, a phosphodiesterase-4 enzyme inhibitor produces antidepressant-like effects by blocking the behavioral, biochemical, neurobiological deficits and histological abnormalities in hippocampus region caused by olfactory bulbectomy. *Psychopharmacology*, 232(3), 623–637.

Jindal, A., Mahesh, R., & Bhatt, S. (2015). Type 4 phosphodiesterase enzyme inhibitor, rolipram rescues behavioral deficits in olfactory bulbectomy models of depression: Involvement of hypothalamic-pituitary-adrenal axis, cAMP signaling aspects and antioxidant defense system. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 132, 20–32.

Kang, N. H., Mukherjee, S., Min, T., Kang, S.C., Yun, J.W. (2018). Trans-anethole ameliorates obesity via induction of browning in White adipocytes and activation of brown adipocytes. *Biochimie*. 151, 1-13.

Kessler, R. C., McGonagle, K. A., Swartz, M., Blazer, D. G., & Nelson, C. B. (1993). Sex and depression in the National Comorbidity Survey I: Lifetime prevalence, chronicity and recurrence. *Journal of Affective Disorders*, 29(2–3), 85–96.

Kim, K. Y., Lee, H. S., & Seol, G.H. (2017). Anti-inflammatory effects of trans-anethole in a mouse model of chronic obstructive pulmonary disease. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 91, 925-930.

Lee, H., Ohno, M., Ohta, S., & Mikami, T. (2013). Regular Moderate or Intense Exercise Prevents Depression-Like Behavior without Change of Hippocampal Tryptophan Content in Chronically Tryptophan-Deficient and Stressed Mice. *PLoS ONE*, 8(7), 1–8.

Leite, J. R., Nóbrega, R. D. A., & Motta, S. C. (2003). Óleos essenciais com propriedades anticonvulsivantes. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 2(1), 3-6.

Li, K., Shen, S., Ji, Y., Li, X., Zhang, L., Wang, X. (2018). Melatonin Augments the Effects of Fluoxetine on Depression-Like Behavior and Hippocampal BDNF–TrkB Signaling. *Neurosci. Bull.* 34(2), 303-311.

Liu, Y., Jia, G., Gou, L., Sun, L., Fu, X., Lan, N., Li, S., Yin, X. (2013). Antidepressant-like effects of tea polyphenols on mouse model of chronic unpredictable mild stress. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior journal*. 104, 27-32.

Lu, X., Kim, C. S., Frazer, A., (2006). Leptin: A potential novel antidepressant. *Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America*. 103(5), 1593-1598.

Macedo, G. V. F., Cladouchos, M. L., Sifonios, L., Cassanelli, P. M., & Wikinski, S. (2013). Effects of fluoxetine on CRF and CRF1 expression in rats exposed to the learned helplessness paradigm. *Psychopharmacology*, 225(3), 647–659.

Machado, D. G., Cunha, M. P., Neis, V. B., Balen, G. O., Colla, A., Bettio, L. E. B., ... Rodrigues, A. L. S. (2013). Antidepressant-like effects of fractions, essential oil, carnosol and betulinic acid isolated from *Rosmarinus officinalis* L. *Food Chemistry*, 136(2), 999–1005.

Manosso, L. M., Moretti, M., Colla, A. R., Ribeiro, C. M., Dal-Cim, T., Tasca, C. I., Rodrigues, A. L. S. (2016). Involvement of glutamatergic neurotransmission in the antidepressant-like effect of zinc in the chronic unpredictable stress model of depression. *Journal Neural Transm.*, 123, 339-352.

Martino, P., (2014). Un análisis de las estrechas relaciones entre el estrés y la depresión desde la perspectiva psiconeuroendocrinológica. El rol central del cortisol. *Cuadernos de Neuropsicología Panamerican Journal of Neuropsychology*. 8 (1), p. 60-66, 2014.

Misharina, T. A., Terenina, M. B., & Krikunova, N. I. (2009). Antioxidant Properties of Essential Oils. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 45(6), 642-647.

Miyagawa, M., Satou, T., Yukimune, C., Ishibashi, A., Semiya, H., Yamada, H., Hasegawa, T., & Koike, K. (2014). Anxiolytic-Like Effect of *Illicium verum* Fruit Oil, trans-Anethole and Related Compounds in Mice. *Phytotherapy Research*, 28, 1710-1712.

Molina, M. R. A. L. et al., (2012). Prevalência de depressão em usuários de unidades de atenção primária. *Rev. Psiq. Clin.*, 39(6), p. 194-197.

Morais, T. H. (2018). *Avaliação Da Atividade Antidepressiva Do Fenilpropanóide 2-Alilfenol Em Camundongos Swiss Submetidos Ao Protocolo De Estresse Subcrônico Imprevisível*. Trabalho de conclusão de curso – Universidade Federal da Paraíba, 69p

Moretti, M., Colla, A., Balen, G. O., Santos, D. B., Budni, J., Freitas, A. E., Farina, M., Rodrigues, A. L. S. (2012). Ascorbic acid treatment, similarly to fluoxetine, reverses depressive-like behavior and brain oxidative damage induced by chronic unpredictable stress. *Journal of Psychiatric Research*. 46, 331-340.

Mu, R. H., Fang, X. Y., Wang, S. S., Li, C. F., Chen, S. M., Chen, X. M., ... Yi, L. T. (2016). Antidepressant-like effects of standardized gypenosides: involvement of brain-derived neurotrophic factor signaling in hippocampus. *Psychopharmacology*, 233(17), 3211–3221.

Muñoz-Acevedo, A., Kouznetsov, V. V, & Stashenko, E. E. (2009). Composición y capacidad antioxidante in-vitro de aceites esenciales ricos en. *Salud UIS*, 41, 287–294.

Nakagawa, Y., & Suzuki, T. (2003). Cytotoxic and xenoestrogenic effects via biotransformation of trans-anethole on isolated rat hepatocytes and cultured MCF-7 human breast cancer cells. *Biochemical Pharmacology*, 66(1), 63–73.

Neis, V. B., Bettio, L. E. B., Moretti, M., Rosa, P. B., Ribeiro, C. M., Freitas, A. E., Gonçalves, F. M., Leal, R. B., Rodrigues, A. L. S. (2016). Acute agmatine administration, similar to ketamine, reverses depressive-like behavior induced by chronic unpredictable stress in mice. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*. 150(151), 108-114.

Nestler, E. J., (2002). Neurobiology of depression. *Neuron*. 34, 13-25.

Neto, J. G. A. (2017). *Efeito do agonista do receptor da nociceptina/orfanina FQ, Ro65-6570, no comportamento do tipo ansioso de camundongos desamparados*. Dissertação, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, p. 66.

Ono, Y., Shi,azawa, M., Ishisaka, M., Oyagi, A., Tsuruma, K., Hara, H. (2012). Imipramine protects mouse hippocampus against tunicamycin-induced cell death. *European Journal Pharmacology*, 696, 83-88.

Padovan-Neto, F. E., Merlo, S., Ross, J. B. de, Bueno-Júnior, L. S., Rohner, C. J. S., Ikeda, É. T., ... Fachim, H. A. (2014). Neurotransmissão glutamatérgica e plasticidade sináptica: aspectos moleculares, clínicos e filogenéticos. *Medicina (Ribeirao Preto. Online)*, 44(2), 143.

Palazidou, E. (2012). The neurobiology of depression. *British medical bulletin*, (101)1, 127-145.

Pariante CM, Lightman SL (2008). The HPA axis in major depression: classical theories and new developments. *Trends Neurosci*, 31: 464–468.

Park, B. K., Kim, Y. R., Kim, Y. H., Yang, C., Seo, C. S., Jung, I. C., ... Lee, M. Y. (2018). Antidepressant-Like Effects of Gyejibokryeong-hwan in a Mouse Model of Reserpine-Induced Depression. *BioMed Research International*.

Pessarico, A. P., Sartori, G., Brüning, C. A., Mantovani, A. C., Duarte, T., Zeni, G., Nogueira, C. W. (2016). A Novel isoquinoline compound abolishes chronic unpredictable mild stress-induced depressive-like behavior in mice. *Behavioral Brain Research*, 307, 73-83.

Pizini, F. L. (2013). *Vias de sinalização implicadas no efeito tipo-antidepressivo induzido pela administração aguda de creatina e cetamina em um modelo de depressão*. Dissertação, Universidade Federal de Santa Catarina, Curitiba, p. 149.

Qiu, F., Zhong, X., Mao, Q., Huang, Z. (2013). Antidepressant-like effects of paeoniflorin on the behavioural, biochemical, and neurochemical patterns of rats exposed to chronic unpredictable stress. *Neuroscience Letters*, 541, 209-213.

Rosa, P.B., Ribeiro, C.M., Bettio, L.E.B., Colla, A., Lieberkn, V., Moretti, M., Rodrigues, A.L. (2014) Folic acid prevents depressive-like behavior induced by chronic corticosterone treatment in mice. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*. 127,1-6.

Schmidt, M. V. et al. (2010). High susceptibility to chronic social stress is associated with a depression-like phenotype. *Psychoneuroendocrinology*. 35, 635- 643.

Seese, R. R., Chen, L. Y., Cox, C. D., Schulz, D., Babayan, A. H., Bunney, W. E., ... Lynch, G. (2013). Synaptic Abnormalities in the Infralimbic Cortex of a Model of Congenital Depression. *Journal of Neuroscience*, 33(33), 13441–13448.

Siba, I. P., (2013). *Avaliação pré-clínica do potencial efeito antidepressivo da miricitrina em modelos animais*. Universidade Federal do Paraná. Curitiba. p.44.

Simões, C. M. O.; Spitzer, V. Óleos voláteis. In: Simões, C. M. O.; Schenkel, E. P.; Gosmann, G.; Mello, J. C. P.; Mentz, L. A.; Petrovick, P. R. *Farmacognosia – da planta ao medicamento*. 5. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/UFSC, 2004. cap. 18, p. 467-495.

Slattery, D. A., Cryan, J. F., (2017). Modelling depression in animals: at the interface of reward and stress pathways. *Psychopharmacology*. 234, 1451-1465.

Song, W., Guo, S., Jiang, S., Wei, L., Liu, Z., Wang, X., Su, Y. (2018). Antidepressant Effects of the Ginsenoside Metabolite Compound K, Assessed by Behavioral Despair Test and Chronic Unpredictable Mild Stress Model. *Neurochemical Research*, 43, 1371-1382.

Sousa, D. P., Silva, R. H. N., Silva, E. F., Gavioli, E. C. (2017). Essential Oils and Their Constituents: An Alternative Source for Novel Antidepressants. *Molecules*. 22(8), 1-22.

Steru, L., Chermat, R., Thierry, B., & Simon, P. (1985). The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. *Psychopharmacology*, 85(3), 367-370.

Stopa, S. R. et al, (2015). Prevalência do autorrelato de depressão no Brasil: resultados da pesquisa nacional de saúde, 2013. *Rev. Bras. Epidemiol.* 18(2), 170-180.

Sufka, K. J., & White, S. W. (2013). Identification of a treatment-resistant, ketamine-sensitive genetic line in the chick anxiety-depression model. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 113, 63–67.

Sun, C. L., Geng, C. A., Yin, X. J., Huang, X. Y., & Chen, J. J. (2015). Natural products as antidepressants documented in Chinese patents from 1992 to 2013. *Journal of Asian Natural Products Research*, 17(2), 188–198.

Sun, G. G., Shih, J. H., Chiou, S. H., Hong, C. J., Lu, S. W., & Pao, L. H. (2016). Chinese herbal medicines promote hippocampal neuroproliferation, reduce stress hormone levels, inhibit apoptosis, and improve behavior in chronically stressed mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 193, 159–168.

Taksand, B. G., Faldu, D. S., Dixit, M. P., Sakaria, J. N., Aglawe, M. M., Umekar, M. J., Kotagale, N. R. (2013). Agmatine attenuates chronic unpredictable mild stress induced behavioral alteration in mice. *European Journal of Pharmacology*, 720, 115-120.

Tye, K. M., Mirzabekov, J. J., Warden, M. R., Ferenczi, E. A., Tsai, H. C., Finkelstein, J., ... Deisseroth, K. (2013). Dopamine neurons modulate neural encoding and expression of depression-related behaviour. *Nature*, 493(7433), 537–541.

Vancassel, S., Leman, S., Hanonick, L., Denis, S., Roger, J., Nollet, M., Bodard, S., Kousignian, I., Belzung, C., Chalon, S. (2008). n-3 Polyunsaturated fatty acid supplementation reverses stress-induced modifications on brain monoamine levels in mice. *Journal of Lipid Research*, 49, 340-348.

Viña, D., Serra, S., Lamela, M., & Delogu, G. (2013). Herbal Natural Products As a Source of Monoamine Oxidase Inhibitors: A Review. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 12(20), 2131–2144.

Vismari, L., Alves, G. J., Palermo-Neto, J. (2008). Depressão, antidepressivos e sistema imune: um novo olhar sobre um velho problema. *Rev. Psiq. Clin.* 35(5), 196-204.

Wang, C., Gan, D., Wu, J., Liao, M., Liao, X., Ai, W. (2018). Honokiol Exerts Antidepressant Effects in Rats Exposed to Chronic Unpredictable Mild Stress by Regulating Brain Derived Neurotrophic Factor Level and Hypothalamus–Pituitary–Adrenal Axis Activity. *Neurochemical Research*, 43, 1519-1528.

Wang, Y., Gao, S. M., Li, R., Zhang, M., Gao, S., & Yu, C. Q. (2016). Antidepressant-like effects of the Radix Bupleuri and Radix Paeoniae Alba drug pair. *Neuroscience Letters*, 633, 14–20.

Willner, P., & Mitchell, P. J. (2002). The validity of animal models of predisposition to depression. *Behavioural pharmacology*, 13(3), 169-188.

Willner, P., (2017a). Reliability of the chronic mild stress model of depression: A user Survey. *Neurobiology of Stress*. 6, 68-77.

Willner, P., (2017b). The chronic mild stress (CMS) model of depression: History, evaluation and usage. *Neurobiology of Stress*. 6, 78-93.

Willner, P., Kruger, J. S., Belzung, C., (2013). The neurobiology of depression and antidepressant action. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. 37, 2331-2371.

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

Wu, Y., Fu, Y., Rao, C., Li, W., Liang, Z., Zhou, C., ... Xie, P. (2016). Metabolomic analysis reveals metabolic disturbances in the prefrontal cortex of the lipopolysaccharide-induced mouse model of depression. *Behavioural Brain Research*, 308, 115–127.

Xing, H., Zhang, X., Xing, N., Qu, H., Zhang, K. (2019). Uncovering pharmacological mechanisms of Zhi-Zi-Hou-Po decoction in chronic unpredictable mild stress induced rats through pharmacokinetics, monoamine neurotransmitter and neurogenesis. *Journal of Ethnopharmacology*, 243, 112079.

Xu, N., Qiu, C., Wang, W., Wang, Y., Chai, C., ... Zhu, D. (2011). HPLC/MS/MS for quantification of two types of neurotransmitters in rat brain and application: Myocardial ischemia and protection of Sheng-Mai-San. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 55, 101-108.

Xue, J., Li, H., Deng, X., Ma, Z., Fu, Q., Ma, S. (2015). L-Menthone confers antidepressant-like effects in an unpredictable chronic mild stress mouse model via NLRP3 inflammasome-mediated inflammatory cytokines and central neurotransmitters. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior journal*. 134, 42-48.

Yalcin, I., Aksu, F., & Belzung, C. (2005). Effects of desipramine and tramadol in a chronic mild stress model in mice are altered by yohimbine but not by pindolol. *European journal of pharmacology*, 514(2), 165-174.

Zalta, A. K. (2011). A meta-analysis of anxiety symptom prevention with cognitive behavioral interventions. *Journal of Anxiety Disorders*, 25, 749-760.

Zhang, K., Yang, J., Wang, F., Pan, X., Liu, J., Wang, L., Su, G., Ma, J., Dong, Y., Xiong, Z., Wu, C. (2016). Antidepressant-like effects of Xiaochaihutang in a neuroendocrine mouse model of anxiety/depression. *Journal of Ethnopharmacology*. 194, 674-683.

Zhang, S., Liu, X., Sun, M., Zhang, Q., Li, T., Zhao, X., Chen, D., & Feng, X. (2018). Reversal of reserpine-induced depression and cognitive disorder in zebrafish by sertraline and Traditional Chinese Medicine (TCM). *Behavioral and Brain Functions*, 14(1), 13.

Zhang, Ying-jin et al. (2012). Fructus Aurantii induced antidepressant effect via its monoaminergic mechanism and prokinetic action in rat. *Phytomedicine*, 19(12), 1101-1107.

Zhu, S., Wang, J., Zhang, Y., Li, V., Kong, J., He, J., & Li, X. M. (2014). Unpredictable chronic mild stress induces anxiety and depression-like behaviors and inactivates AMP-activated protein kinase in mice. *Brain Research*, 1576, 81–90.

Zhu, X., Jing, L., Chen, C., Shao, M., Fan, Q., Diao, J., Liu, Y., Lv, Z., Sun, X. (2015). Danzhi Xiaoyao San ameliorates depressive-like behavior by shifting toward serotonin via the downregulation of hippocampal indoleamine 2,3-dioxygenase. *Journal of Ethnopharmacology*, 160, 86-93.

Zimmermann, F. F., (2013) *Efeito do estresse crônico imprevisível no metabolismo de nucleotídeos e nucleosídeos em encéfalo de zebrafish*. Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, p. 72.

ANEXOS

Anexo A – Certidão de Aprovação do C.E.U.A.



Universidade
Federal da
Paraíba

Comissão de Ética no
Uso de Animais

Reitoria



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "ESTUDO NÃO-CLÍNICO DO DO TRANS-ANETOL EM MODELOS COMPORTAMENTAIS DE DEPRESSÃO", protocolada sob o CEUA nº 6900191118 (ID 000511), sob a responsabilidade de **Mirian G. S. Stiebbe Salvadori** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal da Paraíba (CEUA/UFPB) na reunião de 22/02/2019.

We certify that the proposal "NON-CLINICAL STUDY OF TRANS-ANETHOL IN BEHAVIORAL MODELS OF DEPRESSION", utilizing 320 Heterogenics mice (320 females), protocol number CEUA 6900191118 (ID 000511), under the responsibility of **Mirian G. S. Stiebbe Salvadori** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Paraíba (CEUA/UFPB) in the meeting of 02/22/2019.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: de **02/2019** a **05/2020** Área: **Psicologia**

Origem: **Unidade de Produção Animal IPeFarM**

Espécie: **Camundongos heterogênicos**

sexo: **Fêmeas**

idade: **2 a 3 meses**

N: **320**

Linhagem: **Mus musculus - Swiss**

Peso: **20 a 25 g**

Local do experimento: Laboratório de Psicofarmacologia

João Pessoa, 25 de fevereiro de 2019

Prof. Dra. Islania Gisela Albuquerque Gonçalves
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal da Paraíba

Prof. Dr. Ricardo Romão Guerra
Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal da Paraíba

**Anexo B – Comprovante do Depósito de Patente do Processo de
Derivatização**



22/05/2019 870190048141
21:23

29409161905165276

**Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de
Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT**

Número do Processo: BR 10 2019 010500 3

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 1

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAIBA

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 24098477000110

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

Endereço: Cidade Universitária

Cidade: João Pessoa

Estado: PB

CEP: 58059-900

País: Brasil

Telefone: (83) 32167558

Fax:

Email: inova@reitoria.ufpb.br

Dados do Pedido

Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)

Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54): PROCESSO DE DERIVATIZAÇÃO SELETIVA DE METABOLITOS NEUROQUÍMICOS COM GRUPAMENTO AMINA

Resumo: A presente invenção, destinada a área de produção de fármacos para o Sistema Nervoso Central, se refere a um processo que altera as propriedades físico-químicas de metabolitos neuroquímicos que possuem propriedades polares (com altos pontos de ebulição) possibilitando a sua identificação por meio de métodos de separação gasosa e análises espectrométricas e espectroscópicas.

Dados do Inventor (72)

Inventor 1 de 8**Nome:** SÓCRATES GOLZIO DOS SANTOS**CPF:** 00904935400**Nacionalidade:** Brasileira**Qualificação Física:** Pesquisador**Endereço:** Rua Bartolomeu Luiz Trócoli, nº 627, apart. 1920, Altiplano.**Cidade:** João Pessoa**Estado:** PB**CEP:** 58042-220**País:** BRASIL**Telefone:** (83) 987 870110**Fax:****Email:** socratesgolzio@gmail.com**Inventor 2 de 8****Nome:** ADRIANA MARIA FERNANDES DE OLIVEIRA GOLZIO**CPF:** 04183145430**Nacionalidade:** Brasileira**Qualificação Física:** Pesquisador**Endereço:** Rua Bartolomeu Luiz Trócoli, nº 627, apart. 1920, Altiplano.**Cidade:** João Pessoa**Estado:** PB**CEP:** 58042-220**País:** BRASIL**Telefone:** (83) 996 644123**Fax:****Email:** adrianamfoliveira@gmail.com**Inventor 3 de 8**

Nome: MIRIAN GRACIELA DA SILVA STIEBBE SALVADORI

CPF: 94533261000

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Pesquisador

Endereço: Professor Otávio Costa, nº 151, apart. 1502 A. Bairro Brisamar

Cidade: João Pessoa

Estado: PB

CEP: 58034-137

País: BRASIL

Telefone: (83) 987 430004

Fax:

Email: mirian.salvadori@gmail.com

Inventor 4 de 8

Nome: REINALDO NÓBREGA DE ALMEIDA

CPF: 08693463420

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Pesquisador

Endereço: Av. Esperança, nº 1230, Manaíra.

Cidade: João Pessoa

Estado: PB

CEP: 58038-281

País: BRASIL

Telefone: (83) 322 63459

Fax:

Email: reinaldoan@uol.com.br

Inventor 5 de 8

Nome: FLÁVIO FREITAS BARBOSA

CPF: 01202150470

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Pesquisador

Endereço: Avenida Hilton Souto Maior, nº 76, casa 107, Village Verdi, José Américo.

Cidade: João Pessoa

Estado: PB

CEP: 58073-010

Pais: BRASIL

Telefone: (83) 999 240265

Fax:

Email: barbosa.flaviof@gmail.com

Inventor 6 de 8

Nome: MARCELO SOBRAL DA SILVA

CPF: 13223950478

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Pesquisador

Endereço: Rua Manoel Nóbrega Filho, nº 20, Condomínio Atlantic Vile, casa 13. Bairro Intermare.

Cidade: João Pessoa

Estado: PB

CEP: 58102-290

Pais: BRASIL

Telefone: (83) 999 240265

Fax:

Email: barbosa.flaviof@gmail.com

Inventor 7 de 8

Nome: ANA LUIZA ALVES DIAS

CPF: 01830032410

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Estudante de Graduação

Endereço: Rua Clementina Lindoso, nº 456.

Cidade: João Pessoa

Estado: PB

CEP: 58046-460

País: BRASIL

Telefone: (83) 999 046595

Fax:

Email: aninha.alves.dias@gmail.com

Inventor 8 de 8

Nome: CÉSAR ALVES CARNEIRO

CPF: 06409299400

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Mestrando

Endereço: R. Josué Gomes de Almeida.

Cidade: João Pessoa

Estado: PB

CEP: 58074-084

País: BRASIL

Telefone: (83) 996 481644

Fax:

Email: carneiro.cesaralves@gmail.com

Documentos anexados

Tipo Anexo	Nome
Comprovante de pagamento de GRU 200	00_Comprovante de pagamento.pdf
Relatório Descritivo	01_Relatorio_descritivo.pdf
Reivindicação	02_Reivindicacoes.pdf
Resumo	03_Resumo.pdf