

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CENTRO-OESTE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DESENVOLVIMENTO  
COMUNITÁRIO**

**SAMARAH PERSZEL DE FREITAS**

**Estudo sobre as aplicações de tratamento da *Baccharis dracunculifolia*  
em um modelo de estresse crônico variado em ratos.**

**IRATI  
2015**

SAMARAH PERSZEL DE FREITAS

**Estudo sobre as aplicações de tratamento da *Baccharis dracunculifolia*  
em um modelo de estresse crônico variado em ratos.**

Dissertação de mestrado apresentada  
ao programa Programa de Pós-  
Graduação Stricto Sensu em  
Desenvolvimento Comunitário da  
Universidade Estadual do Centro-  
Oeste como parte dos requisitos para a  
obtenção do título de mestre em  
Desenvolvimento Comunitário

Orientador: Prof. Dr. Carlos Ricardo  
Maneck Malfatti.

**IRATI**

**2015**

Catálogo na Fonte  
Biblioteca da UNICENTRO

F866e FREITAS, Samarah Perszel de.  
Estudo sobre as aplicações de tratamento da *Baccharis dracunculifolia*  
em um modelo de estresse crônico variado em ratos. / Samarah Perszel de Freitas. – Irati,  
PR : [s.n], 2015.  
81f.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Ricardo Maneck Malfatti.  
Dissertação (mestrado) – Programa de Pós Graduação Stricto Sensu em  
Desenvolvimento Comunitário. Universidade Estadual do Centro-Oeste, Paraná.

1. Dissertação – stress. 2. Neuropsicologia. 3. Memória. I. Malfatti, Carlos Ricardo  
Maneck. II. UNICENTRO. III. Título.

CDD 20 ed. 616.9803

Dedico esse trabalho aos meus pais, Aldinar e Bernardete e ao amor da minha vida, Caio.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao amor da minha vida Caio, pessoa que admiro muito pelas suas qualidades, entre elas à paciência, companheirismo, amor e parceira sempre dedicada. Por ter me transformado em uma pessoa melhor.

Aos meus pais Aldinar e Bernardete pelo que são e pelo que me tornaram ser. Agradeço à família que nasci pela vida que tive e pelas oportunidades que ofereceram. Obrigada pelo amor que sempre recebi e por me fazer uma pessoa muito feliz. Agradeço ainda ao meu irmão Eliezer pelo incentivo e apoio!

À Solange Rosset por me transformar em uma pessoa melhor e por ter me auxiliado de modo tão expressivo na realização desse e outros sonhos importantes na minha vida.

Aos meus professores e mestres que me inspiraram e me conduziram a paixão pela docência e pela pesquisa, em especial à Dra. Maria Joana Mader-Joaquim.

Ao Prof. Dr. Plínio Marco de Toni que me apresentou a neuropsicologia, e pesquisa nas neurociências. Por demonstrar que sempre há mais o que conhecer, por incentivar constantemente e estar acessível sempre.

Ao meu orientador Prof. Dr. Carlos Ricardo Maneck Malfatti, por investir e acreditar em mim, mesmo quando eu não imaginava que seria possível. Pela oportunidade de realizar um dos maiores sonhos da minha vida, sem mesmo me conhecer, Obrigada!

A equipe do BIOMED, em especial ao Luiz Augusto, Jéssica, Bruno Elchechem, Renan, André, Juliana e Meiry, sem vocês não seria possível realizar esse trabalho. Ao Doutorando Fábio Seidel dos Santos por toda a assessoria que proporcionou durante toda a pesquisa!

Às minhas amigas Simone, Carla, Renata, Patrícia, Vânia, Maria Elda e Susana Raurich pelo companheirismo e incentivo para o meu desenvolvimento profissional.

Ao Prof. Dr. Vanderlei Aparecido e Prof Dr. Durinézio por todo auxílio em momentos importantes da minha pesquisa.

Ao Prof. Msc. Ivo Ilvan Kerppers pelas orientações e gentileza em ceder um espaço em seu laboratório para realização de parte dos experimentos.

## **Saber viver**

Não sei ... Se a vida é curta  
Ou longa demais para nós,  
Mas sei que nada do que vivemos  
Tem sentido, se não tocamos o coração das pessoas,  
Muitas vezes basta ser:  
    Colo que acolhe,  
    Braço que envolve,  
    Palavra que conforta,  
    Silêncio que respeita,  
    Alegria que contagia,  
    Lágrima que corre,  
    Olhar que acaricia,  
    Desejo que sacia,  
    Amor que promove.  
E isso não é coisa de outro mundo,  
    É o que dá sentido à vida,  
    É o que faz com que ela  
Não seja nem curta, nem longa demais,  
    Mas que seja intensa,  
Verdadeira, pura ... Enquanto durar

**Cora Coralina**

## RESUMO

O presente estudo teve por objetivo investigar os efeitos da administração do extrato de *Baccharis dracunculifolia* sobre parâmetros comportamentais, morfológicos e bioquímicos em ratos submetidos a um modelo de estresse crônico variado. Foram utilizados 60 ratos *Wistar*, machos, com aproximadamente 90 dias no início dos experimentos. Os animais foram divididos igualmente e aleatoriamente em cinco grupos: Controle (Ct); Controle *Baccharis dracunculifolia* (CBD); Estresse crônico (Ec); Estresse crônico + *Baccharis dracunculifolia* 100mg/Kg (Ec/BD - 100); Estresse crônico + *Baccharis dracunculifolia* 200mg/Kg (Ec/BD - 200); Estresse crônico + *Baccharis dracunculifolia* 400mg/Kg (Ec/BD - 400). Os animais foram expostos ao estresse por um período de 40 dias. Diariamente e aleatoriamente escolheu-se um dos seguintes estressores: exposição ao frio, imobilização, inclinação da caixa-moradia, luz intermitente, privação de alimento, nado forçado e ausência de troca de maravalha. Após a última sessão de estresse, os animais foram submetidos às seguintes tarefas comportamentais: labirinto em cruz elevado, *Open Field*, tarefa de comportamento alimentar e labirinto octogonal. No dia posterior à última sessão de teste comportamental, os animais foram eutanasiados mediante decapitação. O sangue troncular foi coletado para análise bioquímica (glicose, colesterol, triglicerídeos e corticosterona). O coração, tecido adiposo (gorduras mesentérica, retroperitoneal e periepididimal), rim e glândula adrenal esquerda foram pesados. Foi realizada também análise histológica do coração, adrenal esquerda e hipocampo esquerdo. Os resultados evidenciaram que o grupo de Ec obteve maior tempo de permanência nos braços fechados, o que caracteriza anedonia. Esses resultados indicam que a *Baccharis dracunculifolia* diminuiu o comportamento ansioso e anedônico dos animais. Do primeiro ao terceiro dia de treinamento da tarefa de comportamento alimentar, os grupos submetidos ao estresse consumiram maior quantidade de alimentos doces do que os grupos controle. Durante a 1ª e a 2ª semana, os animais submetidos ou não ao estresse não apresentaram diferenças no padrão alimentar. Entre a 3ª e 8ª semana que sucederam o experimento, houve uma mudança tanto no peso bruto dos animais quanto no índice de Lee. Sobre os parâmetros bioquímicos pode-se verificar que os níveis de corticosterona nos animais Ec e Ec/400 foi significativamente maior do que os demais grupos. A *Baccharis dracunculifolia* parece também facilitar o processo de aprendizagem. Foi observado aumento significativo da pressão sistólica e média no grupo Ec. Este estudo mostrou que a *Baccharis dracunculifolia* proporciona benefícios da tanto em atividades mnemônicas, em que a planta parece facilitar o processo de aprendizagem, quanto seu efeito cardioprotetor. No entanto, mais estudos são necessários para compreender melhor os benefícios da *Baccharis dracunculifolia* e dos processos envolvidos no estresse crônico em ratos wistar.

**Palavras-chave:** Estresse crônico; memória; *Baccharis dracunculifolia*.

## ABSTRACT

This study looked at the effects of administration of *Baccharis dracunculifolia* extract on behavioral, morphological and biochemical parameters in rats submitted to a model of chronic variable stress. The study used 60 Wistar rats, which were 90-day aged in the beginning of the experiment. The animals were equally and randomly divided in 5 groups: Control (Ct); Control *Baccharis dracunculifolia* (CBD); Chronic stress (Ec); Chronic stress + *Baccharis dracunculifolia* 100mg / kg (Ec / BD - 100); Chronic stress + *Baccharis dracunculifolia* 200mg / kg (Ec / BD - 200); Chronic stress + *Baccharis dracunculifolia* 400mg / kg (Ec / BD - 400). The animals were exposed to stress for a period of 40 days. In this period, one stressor was chosen daily and randomly between the followings: cold exposure, immobilization, the tilt-housing box, flashing light, food deprivation, forced swimming and absence of shavings exchange. After the last stress session, the animals were submitted to the followings behavioral tasks: elevated plus maze, open field task, measurement of palatable food intake, radial arm maze. The day after the last behavioral task session, the animals were euthanized through decapitation. Trunk blood was collected for biochemical analysis (glucose, cholesterol, triglycerides and corticosterone). Heart, adipose tissue (mesenteric, retroperitoneal and periepididymal fat), left kidney and left adrenal gland were weighed. Also, it was performed histological analysis of the heart, left adrenal and left hippocampus. The results showed that the Ec group obtained the highest time spent in the closed arms, which features anhedonia. These results indicate that *Baccharis dracunculifolia* reversed anxious and anhedonic behavior in animals. The first to the third day of training for feeding behavior task, groups submitted to stress consumed more sweet food than the control group. During the 1st and 2nd weeks, the animals submitted or not to stress showed no differences in dietary patterns. Between 3rd and 8th weeks that followed the experiment, there were changes in both the gross weight of the animals and the Lee index. Concerning the biochemical parameters it can be seen that corticosterone levels in animals Ec and Ec / 400 was significantly higher than the other groups. The *Baccharis dracunculifolia* also seems to facilitate the learning process and improves performance in the reference memory tasks. There was a significant increase in systolic and average pressure in the Ec group. This study showed that *Baccharis dracunculifolia* provides benefits of both mnemonic activities, as the plant seems to facilitate the learning process, and its cardioprotective effect. However, more studies are needed to better understand the benefits of *Baccharis dracunculifolia* and the processes involved in chronic stress.

Keywords: Chronic stress; Memory; *Baccharis dracunculifolia*.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Fisiologia desencadeada em situações de estresse Fisiologia envolvida na resposta do estresse.....	17
Figura 2 – Hipófise.....	18
Figura 3 – Sistema Nervoso Simpático e Parassimpático.....	21
Figura 4 – Síntese da tirosina hidroxilase.....	22
Figura 5 – Glândulas adrenais e cortisol.....	24
Figura 6 – Arbusto da Baccharis dracunculifolia – Universidade Centro-Oeste, Campus CEDETEG.....	33
Figura 7 – Procedimento de Gavagem.....	39
Figura 8 – Estufa – Universidade Centro-Oeste, Campus CEDETEG Estufa...40	
Figura 9 – Moinho – Universidade Centro-Oeste, Campus CEDETEG .....	41
Figura 10 – Shaker – Faculdade Campo Real.....	41
Figura 11 – Processo de filtragem.....	42
Figura 12 – Rotaevaporizador .....	42
Figura 13 – Estressor de imobilização.....	43
Figura 14 – Estressor de inclinação de caixa moradia.....	44
Figura 15 – Estressor de nado forçado.....	44
Figura 16 – Labirinto em cruz elevado, imagem rato 01 do grupo controle total.....	46
Figura 17 – Field, imagem rato 01 do grupo controle total.....	47
Figura 18 – Labirinto de oito braços, imagem rato 01 do grupo controle total ..49	
Gráfico 01 – Número de entrada nos BAs (A) e número de entradas nos BFs (B).....	52
Gráfico 02 – Permanência nos BAs (A) e permanência nos BFs (B).....	53
Gráfico 03 – Quadrantes percorridos na tarefa Open Field.....	54
Gráfico 04 – Comportamentos associados na tarefa Open Field.....	54

Gráfico 05 – Tarefa de comportamento alimentar – Dia do teste.....	55
Gráfico 06 – Parâmetros morfológico – controle de peso semanal.....	58
Gráfico 07 – Controle de peso semanal – Fenograma de análise de atributos Cluster – HCA.....	59
Gráfico 08 – Controle de peso semanal – análise de <i>Cluster</i> - HCA por análise de atributos.....	59
Gráfico 09 – Análise de discriminante peso semanal.....	60
Gráfico 10 – Análise da pressão arterial discriminante peso semanal.....	61
Figura 19 – Cortes histológicos de hipocampo CA1.....	63
Figura 20 – Cortes histológicos do coração dos grupos.....	64
Gráfico 11 – Peso do coração dos animais.....	64
Figura 21 – Cortes histológicos da glândula adrenal esquerda dos grupos.....	65

## LISTA DE TABELAS

Tabela 01 – Calendário demonstrativo dos estressores a serem utilizados, sequência e duração.....	45
Tabela 02 – Esquema geral das atividades que foram desenvolvidas .....	51
Tabela 03 – Média e desvio padrão de Comportamento alimentar.....	55
Tabela 04 – Média e desvio padrão dos acertos significativos demonstrados ocorridos no Labirinto Octagonal.....	56
Tabela 05 – Média e desvio padrão significativos referente à entradas em braços que não haviam Froot Loops ocorridos no Labirinto Octagonal.....	56
Tabela 06 – Parâmetros morfológico – rim esquerdo (RE), rim direito (rd), coração (COR), gordura mesentérica (MES), retroperitoneal (RET) e peripididimal (PER).....	57
Tabela 07 – Parâmetros bioquímicos – colesterol (COL), triglicéridos (TRI), glicose (GLI) e corticosterona (CORT).....	62
Tabela 08 – Parâmetros bioquímicos – níveis glicêmicos.....	62

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ACTH – Hormônio adrenocorticotrófico  
CA – Campo aberto  
CRH – Hormônio liberador de corticotropina  
Ct – Grupo controle total  
CBD - Grupo controle *Baccharis Dracunculifolia*  
Ec/Bd100 – Grupo estresse crônico com *Baccharis Dracunculifolia* 100mg  
Ec/ Bd200– Grupo estresse crônico com *Baccharis Dracunculifolia* 200mg  
Ec/ Bd400 – Grupo estresse crônico com *Baccharis Dracunculifolia* 400mg  
ECV – Estresse crônico variado  
GABA – Ácido gama-aminobutírico  
GCs – Glicocorticóides  
GR – Receptores de glicocorticóides  
LCE – Labirinto em cruz elevado  
LO – Labirinto Octagonal  
HHA – Eixo hipotálamo-hipófise-adrenal  
LTP – Potenciação de longa duração  
MR – Receptores de mineralocorticóides  
NMDA – Receptores N-metil-D-aspartato  
OF – Open Field.  
PVN – Núcleo paraventricular do hipotálamo  
SNV – Sistema Nervoso Vegetativo  
SNC – Sistema Nervoso Central  
TEPT – Transtorno de estresse pós-traumático

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	14
1.1 ESTRESSE.....	14
1.1.1 Características gerais.....	14
1.1.2 Receptores sensoriais do estresse.....	16
1.1.3 Fisiologia do estresse.....	17
1.1.4 Sistema neurovegetativo e estresse.....	19
1.1.5 Epinefrina Norepinefrina e Estresse .....	22
1.1.6 Cortisol e Estresse.....	24
1.2 - Memória.....	25
1.2.1 Memória de trabalho.....	27
1.2.2 Memória de longo prazo.....	27
1.2.3 Memória e Estresse.....	29
1.3 Emoções, depressão e estresse.....	30
1.4 Plantas Medicinais e estresse.....	31
1.4.1 <i>Baccharis dracunculifolia</i> .....	33
1.6. Modelo animal em pesquisa com estresse cônico variado.....	36
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	37
2.1 OBJETIVO GERAL.....	37
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	37
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	38
3.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS.....	38
3.2 DESENHO EXPERIMENTAL.....	38
3.3 EXTRATO DA <i>BACCHARIS DRACUNCULIFOLIA</i> .....	40
3.4 MODELO DE ESTRESSE CRÔNICO VARIADO.....	42
3.5 PARÂMETROS COMPORTAMENTAIS.....	46
3.5.1 Labirinto em cruz elevado.....	46
3.5.2 Open Field.....	47
3.5.3 Tarefa de comportamento alimentar.....	48
3.5.4 Labirinto de oito braços.....	48
3.6 CONSUMO DE RAÇÃO, INGESTÃO DE ÁGUA E PESO CORPORAL.....	50
3.7 PARÂMETROS MORFOLÓGICO E BIOQUÍMICOS.....	50
3.7.1 Determinação de parâmetros Morfológico.....	50

3.7.2 Determinação de parâmetros bioquímicos.....	51
3.8 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	51
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>52</b>
4.1 PARÂMETROS COMPORTAMENTAIS.....	52
4.1.1 Labirinto em cruz elevado.....	53
4.1.2 Open Field.....	55
4.1.3 Comportamento alimentar.....	56
4.2 PARÂMETROS MORFOLÓGICOS.....	57
4.2.1 Controle de peso semanal.....	58
4.3 PARÂMETROS BIOQUÍMICOS.....	61
4.4 Análise histológica.....	63
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>66</b>
<b>6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>72</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>73</b>
<b>8. ANEXOS.....</b>	<b>82</b>

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 ESTRESSE

#### 1.1.1 Características Gerais

Os seres vivos estão em constante processo de adaptação e autoproteção aos estímulos ambientais. Para tanto, necessitam de mecanismos fisiológicos e endócrinos para efetivação desse processo. (CAMPEAU *et al.*, 2015, VASCONCELLOS *et al.*, 2003). O movimento entre o estímulo e a resposta fisiológica do processo de adaptação denomina-se estresse (CHROUSOS, 2009). O Estresse é desencadeado por meio das ações fisiológicas e liberação de hormônios importantes como a epinefrina, norepinefrina e cortisol. Por meio destas alterações, o indivíduo gera energia para enfrentar os desafios diários, como acordar (LIPP, 2001, McEWEN, 2000). O problema ocorre quando esse mecanismo de sobrevivência torna-se crônico (MARGARIÑOS, VERDUGO e McEWEN, 1997).

Embora o tema estresse seja amplamente difundido, há certa dificuldade em conceituá-lo. Popularmente, existem dois riscos de interpretação do fenômeno estresse. O primeiro refere-se à banalização do conceito e à falsa sensação de que todos os indivíduos apresentam estresse crônico. Por outro lado, o segundo risco ocorre devido à crença de que uma vez o estresse manifesto, não é possível a recuperação do indivíduo (LIPP, 2007).

Para esclarecer o termo, fazem-se necessárias algumas considerações. Estresse é um termo específico da engenharia e refere-se à ação de forças físicas em estruturas mecânicas, porém esse termo é utilizado na área de saúde para explicar o fenômeno do organismo em sobreviver a situações de risco iminente. Essas condições o induzem a sentir-se ameaçado, irritado, confuso ou excitado de modo a alterar seu equilíbrio interno, denominado homeostase. (CAMPEAU *et al.*, 2015, CARLSON, 2002, LIPP, 2004).

A partir do período paleolítico existem registros de que situações de estresse ocorriam devido à ameaça de outros predadores. Como adaptação, a espécie desenvolveu respostas fisiológicas e emocionais que preparavam o humano para atacar ou fugir. No instante seguinte, ao perceber ausência de

perigo, o organismo retornava ao estado inicial de equilíbrio interno (GOTTIEB, MORASSUTTI e CRUZ, 2011).

O processo de adaptação, portanto tem por objetivo a proteção do indivíduo e de sua espécie. Em um período efêmero, o corpo aciona recursos energéticos, inibe a inflamação e promove resistência contra infecções. Essas mudanças auxiliam na resposta ao estressor (PINEL, 2011). Como consequência, o corpo é preparado para o que Cannon (1914) denominou resposta *fight or flight*, assim o organismo está pronto para lutar ou fugir.

No decorrer da história da humanidade, as situações de ameaças mudaram. Na atualidade, o estressor, de acordo com Lipp (2004), pode ser externo ou interno e sua identificação nem sempre é clara. Os estressores externos são caracterizados por mudanças ambientais. Essas mudanças podem ser positivas ou negativas, intensas ou ínfimas, como por exemplo, alterações na rotina. No humano, os cinco principais estressores externos são: falecimento do cônjuge, divórcio, prisão, doenças e casamentos. Por outro lado, os estressores internos estão relacionados ao padrão de funcionamento comportamental. Por vezes, o indivíduo interpreta e reage a situações do modo rígido, ansioso e apresenta reações nem sempre positivas e que geram resposta crônica do estresse, como sentir desejo de ser aceito, perfeito ou amado constantemente pelas pessoas que o rodeiam. Outro estressor interno importante é a pressa (ROSSET, 2013, LIPP, 2001, LIPP, 2007).

A pressa é considerada atualmente uma das principais fontes internas geradoras de estresse. Denominada Síndrome da Pressa é observado um padrão de funcionamento específico em algumas pessoas, posteriormente identificadas como Padrão Tipo A. Pessoas com padrão Tipo A são muito dinâmicas, intensas, estão sempre apressadas e são facilmente irritadas. Normalmente são muito bem sucedidas profissionalmente, buscam incessantemente o sucesso e aprimoramento pessoal e profissional. Também apresentam maior propensão a desenvolverem diversas enfermidades como infarto e úlceras (BUBELLA *et al.*, 2014, FRIEDMAN, BOOTH-KEWLEY, 1987).

Quando o processo de adaptação sofre alterações devido aos estressores externos, internos ou ao padrão de funcionamento tipo A ocorre a síndrome de adaptação. Selye (1936) publicou sobre a síndrome de adaptação, posteriormente conhecida como resposta de estresse crônico. Para Selye, o

estresse apresenta três fases: alerta, resistência e exaustão. A fase de alerta refere-se ao momento em que o organismo detecta o risco iminente e prepara-se para defesa. Na de resistência, embora ocorra ausência de ameaça, o organismo mantém a resposta de alerta. O organismo busca o reequilíbrio, no entanto gera um desgaste significativo e generalizado sem causa aparente. Na terceira, a de exaustão, há uma resposta semelhante a fase de alerta, contudo o indivíduo manifesta doenças tanto físicas quanto psicológicas, como a depressão, podendo conduzi-lo à morte. Lipp (2004) inseriu outra fase, entre a resistência e a exaustão, denominada fase de quase exaustão. Ela refere-se ao momento em que o organismo começa a apresentar dificuldade para reestabelecer a homeostase e oscila entre a sensação de tranquilidade ou bem-estar e cansaço, ansiedade ou desconforto. Para Lipp (2007), nessa fase aparecem algumas doenças e sintomas importantes, que devem ser tratados para que o estresse não evolua para a fase de exaustão.

Para compreender o estresse crônico, faz-se necessária uma breve explanação sobre a identificação do estresse por meio de receptores sensoriais.

### 1.1.2 RECEPTORES SENSORIAIS DO ESTRESSE

Um estressor pode estimular vias aferentes distintas e específicas. Essas vias aferentes distintas acessam o mesmo sistema fisiológico efetor, porém a localização do receptor do estímulo altera a magnitude da resposta ao estresse, fazendo com que ocorram intensidades de ameaça diferentes (RUIZ *et. al.* 2007; DINIZ, 2012).

Os receptores do estímulo estressor podem ser somáticos ou viscerais e detectam variações de diversas formas de energia, a citar: mecânica, química e térmica. Esses têm como função converter o estímulo em energia elétrica e sinais químicos que foram interpretados cognitivamente de modo a continuar o processo de envio da informação, portanto podem ser denominados de transdutores. Os transdutores têm como objetivo identificar os tipos de estressores e conduzi-los (FRANCI, 2005).

Atualmente, os estressores são classificados como: cognitivos e não cognitivos. Os estressores cognitivos ativam os receptores das vias somatossensoriais (estímulos mecânicos, térmicos, visuais, vestibulares,

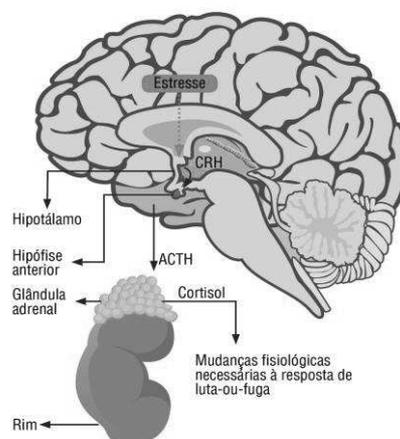
olfativos e acústicos). De outra forma, os receptores das vias viscerossensoriais são responsáveis por sinais nervosos e hormonais. Os receptores de estressores não cognitivos são originados de estímulos diversos como: vírus, bactérias, tumores. Dessa forma, eles são decodificados pelo sistema imunológico que funciona como receptor destes sinais não cognitivos para o sistema nervoso. Assim, o sistema imunológico é responsável tanto pela proteção contra ameaças à integridade do organismo quanto pela interpretação de estímulos estressores não cognitivos sensoriais e hormonais (FRANCI, 2005).

Os receptores sensoriais têm como função emitir sinais elétricos e químicos para o sistema nervoso central que mobilizará o organismo para proteção do indivíduo. Esse processo é fisiológico e faz-se necessária uma breve descrição desse processo.

### 1.1.3 FISILOGIA

No instante em que o organismo recebe o estímulo estressor e o decodifica, interpretando a situação como de risco iminente, o organismo prepara-se fisiologicamente para defender-se. O sistema fisiológico demonstrado na figura 01 responsável pela resposta de estresse é composto por: eixo hipotálamo, hipófise e córtex adrenal (HHA), sistema imunológico, sistema límbico cortical e subcortical, sistemas aminérgicos centrais e o sistema neurovegetativo (DINIZ, 2012, RUIZ *et. al.* 2007, FRANCI, 2005, TIMO-LARIA 1999, BEAR, CONNORS e PARADISO, 2008, E CARLSON, 2002).

**Figura 01:** Fisiologia desencadeada em situações de estresse.

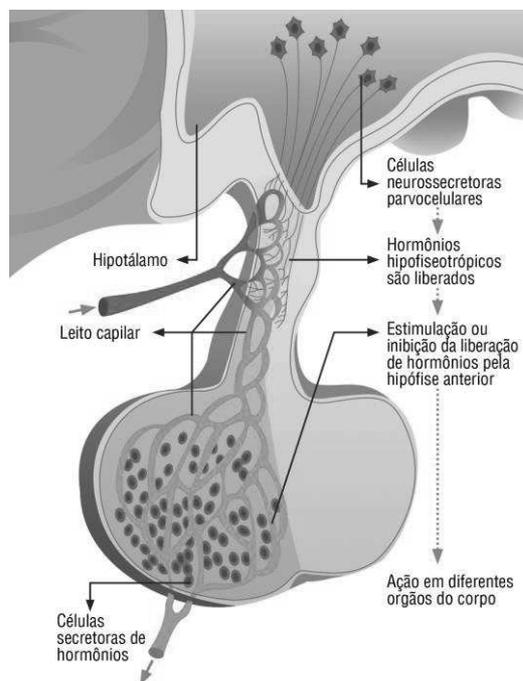


**Fonte:** da Autora.

O hipotálamo é responsável pelo controle de funções vegetativas, endócrinas e comportamentais importantes. Sobre as funções vegetativas e endócrinas reguladas pelo hipotálamo, pode-se citar: regulação de temperatura, controle cardiovascular e estimulação da hipófise para secreção de hormônios. No que se refere às atividades comportamentais, principalmente o núcleo paraventricular do hipotálamo é responsável pelas sensações de medo e reconhecimento de punição. Ao receber o estímulo estressor, o encéfalo ativa o hipotálamo, especificamente o núcleo para-ventricular (GUYTON, HALL, 2006).

Uma vez ativado, o hipotálamo secreta o hormônio liberador de corticotrofina (CRF) para a glândula hipófise, também denominada glândula pituitária. A hipófise é responsável pelo controle de diversos órgãos por meio de síntese de hormônios e é dividida em Neuro-hipófise e Adeno-hipófise. O CRF ativa um grupo de células da adeno-hipófise que tem como função liberar o hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), como pode ser observado na figura 02 (GUYTON, HALL, 2006, BEAR, CONNORS e PARADISO, 2008, CARLSON, 2002).

**Figura 02:** Hipófise.



**Fonte:** da Autora.

O ACTH é secretado na circulação e enviado para as glândulas adrenais. Nas glândulas adrenais o ACTH estimula duas áreas: o córtex adrenal e a medula adrenal. No córtex adrenal o ACTH estimula a produção de cortisol e na medula adrenal o ACTH estimula a liberação de epinefrina e norepinefrina. Para compreender a fisiologia envolvida no estresse é fundamental o entendimento do sistema neurovegetativo (LENT, 2010, BEAR, CONNORS e PARADISO, 2008, E CARLSON, 2002).

#### 1.1.4 SISTEMA NEUROVEGETATIVO

A função do sistema neurovegetativo (SNV) é promover a adaptação e homeostasia do organismo, portanto exerce papel fundamental no que se refere à resposta ao estresse (BEAR, CONNORS e PARADISO, 2008). O SNV envolve uma complexa e extensa rede neuronal com atuação direta em órgãos e tecidos. Na figura 03 pode-se observar que o SNV é composto pelo sistema nervoso simpático (SNS) e pelo sistema nervoso parassimpático (SNP). O SNS e o SNP possuem sistemas complementares.

O SNS está localizado na substância cinzenta das regiões da medula espinhal, especificamente nas regiões torácica e lombar. As fibras dos neurônios conectam-se pelas raízes ventrais e posteriormente formam o nervo espinhal. O nervo espinhal conecta-se aos gânglios simpáticos e formam uma cadeia ganglionar simpática. Os gânglios simpáticos possuem dois tipos de terminações axônicas - pré-ganglionares e pós-ganglionares que recebem as informações internas e externas. (CARLSON, 2002).

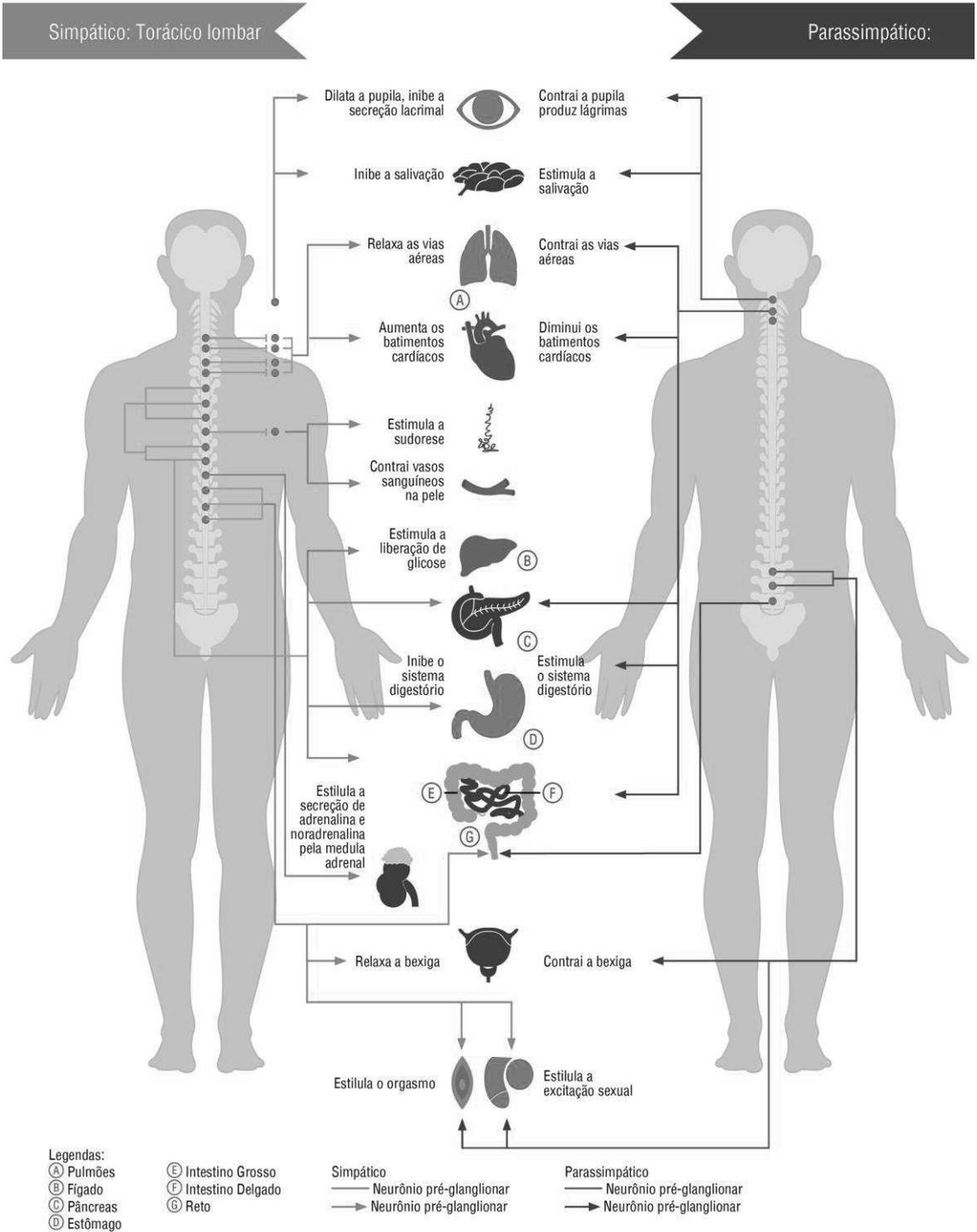
O sistema nervoso simpático tem como função aumentar gasto energético provocado por um estímulo interno ou externo e está intrinsecamente relacionado às respostas de estresse. É responsável, dentre outras funções, por: dilatar as pupilas; inibir a secreção lacrimal; inibir a salivação; relaxar as vias aéreas; aumentar a frequência dos batimentos cardíacos; aumentar a produção de sudorese; estimular a liberação da glicose; contrair os vasos sanguíneos da pele; inibir a digestão; estimular a secreção de epinefrina e norepinefrina; e relaxar o reto e a bexiga (BEAR, CONNORS e PARADISO, 2008, PINEL, 2011).

Por outro lado, o SNP está localizado em dois pontos extremos, denominados crânio-sacral, pois está situado nos núcleos de nervos cranianos específicos, principalmente o nervo vago, e na coluna intermediária da substância cinzenta situado na região sacral da medula espinhal. As sinapses do SNP ocorrem nos neurônios pré-ganglionares e pós-ganglionares. Os neurônios pré-ganglionares e pós-ganglionares SNP liberam acetilcolina (BEAR, CONNORS e PARADISO, 2008)

O sistema nervoso parassimpático, além de outras funções, é responsável por: contrair as pupilas; produzir lágrimas; estimular a salivação; contrair as vias aéreas; diminuir os batimentos cardíacos; ativar o pâncreas; estimular o sistema digestório e intestinos delgado e grosso; e também contrair a bexiga (CARLSON, 2002).

**Figura 03: Sistema Nervoso Simpático e Parassimpático**

**A ESTRUTURA DO SISTEMA NERVOSO**

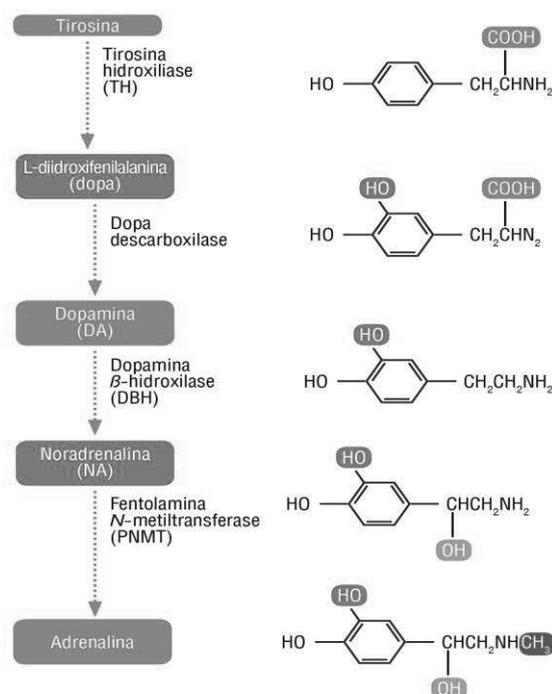


Fonte: da Autora.

### 1.1.5 ADRENALINA, NORADRENALINA E ESTRESSE

A adrenalina e a noradrenalina são aminas biogênicas e pertencem ao grupo das catecolaminas. As catecolaminas são oriundas do aminoácido tirosina, que é responsável, entre outras funções, pela síntese da adrenalina. Os neurônios catecolaminérgicos possuem a enzima *tirosina hidroxilase (TH)* que é o primeiro passo para a síntese das catecolaminas. A conversão acontece em dopa (L-diidroxifenilamina). A dopa é favorecida pela enzima *dopa descarboxilase*. Dessa maneira, os neurotransmissores de noradrenalina possuem, além do *TH* e da *dopa descarboxilase*, a conversão da enzima dopamina  $\beta$ -*hidroxilase (DBH)*, que converte dopamina em noradrenalina. Os neurônios adrenérgicos possuem a enzima *fentolamina N-metil-transferase (PNMT)*, que tem como função converter a noradrenalina em adrenalina (RODRIGUES et al, 2005, BEAR, CONNORS e PARADISO, 2008). O processo de síntese da epinefrina e norepinefrina podem ser observados na figura 04.

**Figura 04:** Síntese da Tirosina Hidroxilase como precursor da Adrenalina.



**Fonte:** da Autora.

Em humanos, sobre os rins estão localizadas as glândulas adrenais, que produzem o cortisol. No humano, essas glândulas pesam cerca de 4 gramas e são divididas em medula adrenal e córtex adrenal. A medula adrenal tem capacidade aproximada de 20% da área central da glândula e tem como função secretar hormônios relacionados ao sistema neurovegetativo simpático. Os hormônios secretados são *norepinefrina* e *epinefrina*, que são liberados pelos nervos simpáticos que cobrem a maior parte dos órgãos e músculos do corpo (GUYTON e HALL, 2006 e PINEL, 2011).

Os receptores principais de noradrenalina estão localizados no *locus ceruleus*, na região da ponte, tálamo e bulbo, porém existem receptores em outras áreas cerebrais. Esses receptores estão estrategicamente posicionados nesta região devido à importância em estimular a atenção do indivíduo aos eventos externos e são fundamentais nas respostas ao estresse. Entre os diversos tipos de receptores de norepinefrina, há um grupo denominado receptores adrenérgicos – sensíveis tanto a norepinefrina quanto a epinefrina – , que possui receptores de norepinefrina  $\beta_1$  e  $\beta_2$  e receptores de epinefrina  $\alpha_1$  e  $\alpha_2$  (SCHUTSKY et al, 2011).

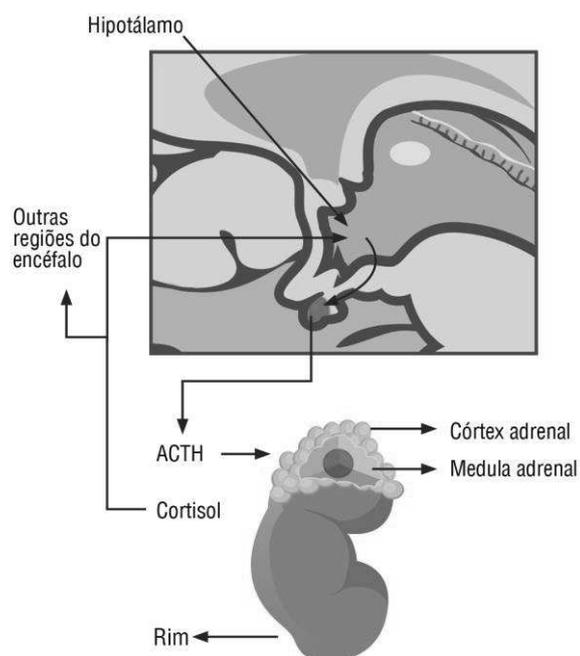
A liberação de epinefrina é ativada quando o organismo percebe risco eminente. Uma vez acionada eleva a pressão e o fluxo sanguíneo em músculos voluntários para que o organismo tenha mais energia em resposta de luta ou fuga. Os receptores de epinefrina alfa adrenérgicos, beta<sup>1</sup> adrenérgico e beta<sup>2</sup> adrenérgico e têm como função a vasoconstrição e vasodilatação. A epinefrina controla frequência cardíaca, pressão arterial e broncodilatação. Já a norepinefrina tem como função principal aumentar o influxo celular de cálcio e manter a pressão sanguínea normais. (BEAR, CONNORS e PARADISO, 2008, GUYTON e HALL, 2006 e LOBO, 2011). Para que ocorra a resposta de estresse no organismo, além da epinefrina e da norepinefrina, um hormônio fundamental nesse processo é o cortisol, que será mencionado a seguir.

### 1.1.6 CORTISOL E ESTRESSE

O cortisol mobiliza os aminoácidos dos tecidos periféricos reduzindo reservas proteicas em algumas células musculares. Mobiliza os ácidos graxos do tecido adiposo, aumentando a concentração de ácidos graxos livres, para que o corpo obtenha mais energia. Exerce um papel imunológico importante, auxiliando em efeitos antiinflamatórios gerais e específicos, a citar as inflamações alérgicas e provocadas por doenças infecciosas (GUYTON e HALL, 2006, SAPOLSKY, 1999). O cortisol é produzido nas glândulas adrenais como pode-se observar na figura 05.

O córtex adrenal libera hormônios do grupo corticoesteróides, a citar: mineralocorticóides, glicocorticóides e andrógenos. O hormônio glicocorticóide tem como função aumentar a energia corporal, portanto aumenta o nível de glicemia e modifica o metabolismo das proteínas e das gorduras. O glicocorticóide cortisol estimula a gliconeogênese ocasionando aumento de glicose plasmática, enquanto diminui a utilização da glicose na maioria das células. Como consequência, há um aumento significativo da concentração de glicose no sangue (GUYTON e HALL, 2006 e PINEL, 2011).

Figura 05: Glândulas adrenais e o cortisol.



**Fonte:** da autora.

O cortisol quando secretado durante um longo período de tempo, pode apresentar resultados nocivos ao organismo, também conhecido como neurotoxicidade por estresse crônico. Entre os efeitos de sua produção excessiva estão: diminuição de resistência imunológica devido à ação imunossupressora que explica em parte a suscetibilidade a formação de úlceras gastroduodenais; aumento da pressão arterial; aumento de peso em decorrência necessidade de reserva lipídica e diminuição da massa muscular devido à quebra proteica durante o processo de gliconeogênese. A ativação do sistema nervoso simpático pode causar taquicardia e taquipnéia, podendo levar o indivíduo a desenvolver problemas respiratórios e infarto do miocárdio (SAPOLSKY, 1999, GOTTIEB, MORASSUTTI e CRUZ, 2011, LENT, 2010). Além dos efeitos citados, a exposição prolongada de glicocorticoides, especificamente o cortisol, pode causar atrofia ou morte neuronal na região hipocampal, especialmente nas células CA3 e CA4 do hipocampo. A região do hipocampo está diretamente relacionada com as funções mnemônicas, portanto a diminuição ou perda de células hipocampais estão diretamente relacionadas a prejuízos na capacidade de retenção das informações (McEWEN, B.S 2000, McEWEN, B.S., SAPOLSKY R.M, 1995, VASCONCELLOS et al., 2005). Para descrever os efeitos do estresse crônico sobre a memória, faz-se necessária uma breve explicação sobre como funciona a memória e seus subtipos.

## 1.2 MEMÓRIA

A memória é definida como a capacidade de armazenamento de informações, tanto de curto quanto de longo prazo (LEZAK., HOWIESON, LORING, 2004). O primeiro estudo sobre a memória foi desenvolvido por Hermann Ebbinghaus (1850-1909) no livro *Über das Gedächtnis*, publicado em 1885 e traduzido para o inglês em 1913 com o título de *Memory: A Contribution to Experimental Psychology*. Para explicar a fisiologia envolvida na aprendizagem e memória, bem como os prejuízos causados pelo estresse, faz-se necessária uma breve explanação sobre as áreas cerebrais envolvidas no processo de memorização.

A estimulação pré-sináptica mais intensa, denominada também de potencial de ação de longa duração de circuitos situados na região do hipocampo alteram a formação sináptica e esse processo parece estar relacionado ao aprendizado e à memória (CARLSON, 2002).

O lobo temporal anterior, especificamente o complexo hipocampal composto por: giro denteado; hipocampo; subículo; para-subículo e pré-subículo, o córtex entorrinal e amígdala estão associados à memória em roedores (Rodríguez, 1999). Estas regiões são responsáveis pelo armazenamento das informações e são transmitidas da seguinte forma: as vias aferentes e eferentes do complexo hipocampal comunicam-se com o córtex entorrinal que emite o sinal para as células granulares do giro denteado, que por meio da via perfurante transmite o conteúdo para a camada CA3 do hipocampo. Ao receber as informações a camada CA3 apresenta duas possibilidades de encaminhamento da informação. Na primeira, o conteúdo é destinado a camada CA1 do hipocampo e permanece armazenada. Contudo, a segunda possibilidade é o envio da informação para estruturas do fórnix e prosencéfalo basal, que posteriormente enviam o sinal pra CA1 (CARLSON, 2002). Além da comunicação elétrica existente, o sistema endócrino também possui papel fundamental no processo de memorização.

O hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), a epinefrina, norepinefrina, opióides endógenos, principalmente a  $\beta$ -endorfina, vasopressina, ocitocina e glicocorticoides são fundamentais para a consolidação da memória. As áreas de atuação destes agentes são: o septo medial no caso dos opióides e área basolateral do núcleo amigdalóide. O estado de alerta é de fundamental no processo de aprendizagem e memorização e o processo de armazenamento de informações é complexo e de difícil mapeamento. No momento, foram registrados 134 diferentes tipos de memória e, embora o tema seja amplamente investigado, seu conceito permanece controverso. Atualmente o modelo de memória mais utilizado sugere a existência de diversos subsistemas que trabalham concomitantemente de modo colaborativo (SPREEN, STRAUSS, SHERMAN, 2006, LEZAK, HOWIESON, LORING, 2004, WALSH, 1987).

Entre os subsistemas mnemônicos mais estudados estão: a memória operacional, conhecida também como *working memory*, memória de curto

prazo e memória de longa duração que se subdivide em explícita ou implícita. A memória explícita pode ser episódica (eventos) ou semântica (informações categorizadas e conceitos), enquanto que a memória implícita apresenta quatro subdivisões: *priming*, procedimento, emocional e aprendizado motor condicionado (MALLOY-DINIZ et al 2007). A seguir, cada uma delas será descrita mais detalhadamente.

### 1.2.1 MEMÓRIA OPERACIONAL

A memória de trabalho é um sistema que conduz as informações cognitivas tais como a aprendizagem e o raciocínio. Baddeley (2011) propõe o conceito de um centro de administração da informação denominado Executivo Central que tem por objetivo o direcionamento adequado das atividades cognitivas para que aprendizagem e raciocínio obtenham êxito. Ao receber a atividade cognitiva, o sistema Executivo Central direciona as informações para um dos três sistemas distintos de armazenamento de informação: a alça fonológica, o rascunho visuo-espacial e “Buffer” episódico. A alça fonológica é responsável pela administração da informação verbal, enquanto que o rascunho visuo-espacial armazena mensagens visuais e espaciais. O “Buffer” episódico armazena informações temporárias, além de codificar informações da memória de longo-prazo e de sistemas subsidiários em apenas uma informação episódica (BADDELEY, 2011; OLIVEIRA, 2007; SANTOS, 2004).

### 1.2.2 MEMÓRIA DE LONGO PRAZO

A memória de longo prazo é subdivida em memória implícita e explícita devido tanto às funções exercidas quanto à circuitaria neural envolvida em cada processo. A circuitaria predominantemente envolvida no processo de memória implícita contempla: substância negra, dopamina, informações sensoriais e motoras, tálamo ventral, glânglios da base e outros sítios do neocórtex (BADDELEY, A. D. ANDERSON M.C. EYSENCK M.W, 2011, WILSON, 2011, MALLOY-DINIZ et al 2007).

A memória implícita, denominada também memória não declarativa é subdividida em: *priming*, procedimentos, emocional e aprendizado motor condicionado. *Priming* é a capacidade de pré-ativação como associação. Por

exemplo, ao se memorizar uma lista de palavras, essa tarefa será mais facilmente realizada se nela houver *priming semântico*, ou seja, se as palavras estiverem relacionadas entre si como xícara, chá, colher, açúcar, toalha etc, ou lápis, papel, palavra, texto etc. A memória implícita de procedimento é responsável pela aprendizagem de habilidades utilizadas no cotidiano, podem ser sensoriais ou cognitivas. As informações são armazenadas por meio de repetições, isto é, por condicionamento, e tem como principal função facilitar as atividades diárias. A memória implícita emocional diz respeito a uma resposta emocional quando alguma situação acontece, como por exemplo, a queda de um galho na floresta que pode gerar um sentimento de medo. Essa memória é intrinsecamente relacionada a resposta de estresse. A memória de aprendizado motor condicionado refere-se à habilidade motora em executar atividades aprendidas por treino, a citar costura à mão, andar de bicicleta e dirigir (BADDELEY, A. D. ANDERSON M.C. EYSENCK M.W, 2011, WILSON, 2011, MALLOY-DINIZ *et al* 2007, SCHACTER, 1992).

Memória Declarativa é entendida como a capacidade de reunir e evocar informações referentes a experiências e é subdividida em memória episódica e memória semântica. (BADDELEY, A. D. ANDERSON M.C. EYSENCK M.W, 2011, WILSON, 2011, MALLOY-DINIZ *et al* 2007). A capacidade de armazenar conhecimentos acerca do mundo como nomes de lugares, descrições de acontecimentos históricos, vocabulários e normas sintáticas é de responsabilidade da memória semântica. Por outro lado, a memória episódica refere-se à capacidade de armazenar episódios temporais como aniversários, formatura, viagem e é um tipo mnemônico amplamente investigado (BADDELEY, A. D. ANDERSON M.C. EYSENCK M.W, 2011, WILSON, 2011, MALLOY-DINIZ *et al* 2007).

### 1.2.3 MEMÓRIA E ESTRESSE

Quando uma situação é ameaçadora, a amígdala envia sinais para o sistema neurovegetativo que automaticamente liberam epinefrina e cortisol ao organismo. O problema ocorre quando o estímulo estressor é constante. Sabe-se que pessoas que sofrem de estresse crônico apresentam uma redução do hipocampo, conduzindo o organismo a diminuição significativa da capacidade de armazenamento de novas informações e em casos graves há possibilidade de inatividade mnemônica (BADDELEY, A. D. ANDERSON M.C. EYSENCK M.W, 2011, GAMARO, 1999).

Um estudo de Gilbertson et al (2002) demonstrou a ocorrência de atrofia do hipocampo está relacionada com o transtorno de estresse pós-traumático (TEPT). Para realizar essa afirmação, acompanhou gêmeos univitelinos em que um participou da guerra do Vietnã e outro não. Os resultados demonstraram que independentemente de terem participado ou não da guerra, os participantes que apresentaram redução de hipocampo eram mais suscetíveis ao TEPT. Lipp (2007) descreve um prejuízo significativo à capacidade de armazenamento de informações, principalmente na fase de resistência ao estresse. O prejuízo mnemônico causado pelo estresse pode ser explicado por análises bioquímicas e fisiológicas.

As reações fisiológicas ocorridas durante o estresse podem causar alterações nas enzimas  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  - ATPases, que são enzimas importantes para a repolarização e preparação de novos potenciais de ação. Essas alterações ocorrem tanto no hipocampo quanto na amígdala, áreas intrinsecamente relacionadas à capacidade mnemônica. A ativação da amígdala aumenta os sintomas ansiosos e depressivos. Porém, a ansiedade aumenta a ativação da amígdala que em situações de estresse exerce influência nos potenciais de ação de longa duração no hipocampo, causando assim prejuízo nas regiões hipocampais (CREMA et al. 2010; KIM; DIAMOND, 2002; VASCONCELLOS et al., 2005; GAMARO et al, 2003).

Há uma diminuição e falência de neurônios significativa principalmente nas áreas hipocampais (CA3) decorrente níveis elevados de cortisol (SAPOLSKY, 2000). Os potenciais de ação de longa duração, envolvidos diretamente no processo de aprendizagem, são alterados de modo que em casos graves podem ser praticamente nulos (KUMAR, 2011).

### 1.3 EMOÇÕES, DEPRESSÃO E ESTRESSE

Damásio (1996) descreve que o ser humano é programado não apenas para viver socialmente, mas para buscar constantemente a sensação de bem-estar. A busca pelo bem-estar faz com nossas decisões sejam tomadas fundamentalmente a partir de nossas emoções. Portanto, as emoções são inerentes ao humano e desempenham um papel importante no que se refere a sobrevivência e adaptação (CARLSON, 2002). No entanto, alguns indivíduos apresentam dificuldade em administrar as emoções e em casos severos podem desenvolver transtornos afetivos e de humor. A depressão é um transtorno de humor caracterizado por: sentimento profundo de menos valia; culpa excessiva; anedonia; alteração do comportamento alimentar, isto é, aumento ou diminuição significativa da ingestão e escolhas de alimentos; alteração de funções gastrointestinais; de sono entre outras.

Estudos têm demonstrado alterações morfológicas importantes em pessoas com depressão. Abdallah *et al* (2015) observou uma diminuição no volume do hipocampo e áreas hipocampais e alterações na captação do ácido gama-aminobutírico (GABA). O GABA é um importante neurotransmissor responsável pelo controle inibitório e uma de suas funções é a hiperpolarização da membrana do neurônio o que facilita a entrada de cloreto. Diversos Antidepressivos tem como função reforçar a ação de GABA no SNC (CARLSON, 2002). Abdallah *et al* (2015) notou uma redução de GABA principalmente na área pré-frontal em pessoas com depressão. Essa redução pode ser explicada pelo fato de que o hipocampo, além de ser responsável pelas funções mnemônicas e de aprendizagem, também apresenta um papel importante na neurogênese. Caracteriza-se neurogênese pela capacidade do cérebro em produzir novos neurônios. Como descrito em capítulos anteriores, o hipocampo é sensível à resposta ao estresse. Esse seria um fator importante no que se refere a associação entre depressão e estresse.

O estudo de Jacob, Praag e Gage (2000) sugeriu que a depressão está relacionada a uma diminuição da neurogênese da região hipocampal devido à indução de resposta ao estresse. Diversos estudos com modelos animais demonstram a diminuição da neurogênese quando os animais são expostos a situações de estresse (CAMERON, GOULD, 1994; GOULD, MCEWEN, 1993).

Outro fator que corrobora com o fato de que o estresse e a depressão diminuem a neurogênese da região hipocampal são os estudos com tratamentos específicos para depressão. Esses estudos sugerem que tanto o uso contínuo de medicamentos antidepressivos, quanto a utilização de terapia eletroconvulsiva aumentam a neurogênese hipocampal (MALBERG, 2000, MADSEN *et al* 2000).

#### 1.4 PLANTA MEDICINAIS E O ESTRESSE

A utilização de plantas para tratamentos em diversos contextos é tão antigo quanto a história da humanidade. No seguimento acadêmico e farmacológico, as plantas que possuem flavonóides estão em evidência, devido principalmente à sua atividade antibacteriana e proteção da célula em relação ao estresse oxidativo (DOROKAR *et al* 2015). O interesse pelas substâncias ativas das plantas está relacionado principalmente à sua utilização como fonte de matéria prima para elaboração de princípios ativos essenciais para o desenvolvimento de fármacos e agentes fitoterápicos. O importância das plantas em relação a promoção da saúde desenvolveu interesse em áreas como agronomia, que tem o intuito de aprofundar a utilização das plantas de modo adequado, assim como ampliar o consumo (SIMÕES, SCHENKEL, 2002, SFORCIN *et al*, 2012).

Para Simões *et al* (2010), compreender o universo dos recursos naturais e explorar as substâncias ativas das plantas auxilia significativamente no desenvolvimento da saúde no país e melhora a qualidade de vida da população local. Essa informação corrobora com a Organização Mundial de Saúde (OMS), que recomenda o uso de plantas medicinais para tratamento de doenças, principalmente nos países em desenvolvimento (OMS, 2002).

Os resultados de pesquisas com plantas medicinais possibilitam melhorias em diversos níveis da sociedade. No nível individual, a descoberta de princípios ativos eficientes promovem melhora da qualidade de vida em casos de doenças crônicas. No nível social, a descoberta permite o desenvolvimento de fármacos fitoterápicos. No setor econômico, promove desenvolvimento de princípios ativos com baixo custo e grande rentabilidade.

No nível ecológico, o possibilita a conservação da biodiversidade e diversidade cultural (ELISABETSKY, COSTA-CAMPOS, 1996).

Algumas plantas apresentam flavonoides, que têm como função a floração e polinização das plantas. Os flavonóides são fundamentais no processo de sobrevivência, pois é a defesa da planta contra micro-organismos patogênicos e infestações por pestes. Devido à sua presença, influencia a cor e sabor da plantas e de seus frutos. Atualmente a comunidade científica tem estudado intensamente os flavonoides, principalmente em decorrência da sua capacidade antioxidante, que é potente contra os radicais livres. Além disso, são responsáveis pela proteção celular, possuem a atividades de potencial de ação estrogênica e anti-prolífica (SFORCIN *et al* 2012).

Biondo *et al* (2011) realizaram um estudo com a *Baccharis trimera* e os resultados demonstraram uma inibição da secreção de ácido gástrico e ação colinérgica reguladora. Esse resultado evidenciou que o extrato da planta pode resultar em atividades anti-úlceras em ratos e em camundongos. Dessa forma, corrobora com a literatura que descreve o gênero *Baccharis* e seus efeitos protetivos, que foram descritos detalhadamente no próximo tópico.

Isla *et al* (2009) descreveram que as plantas medicinais apresentam concentrações diferentes de princípios ativos dependendo do período sazonal. No entanto, mesmo apresentando oscilações, pode-se perceber uma alta concentração de flavonoides no gênero *Baccharis s.p.* Os autores sugeriram que o própolis avindo da *Baccharis s.p.* possui compostos bioativos importantes no combate do estresse oxidativo.

O estudo de Guimarães *et al* (2012) indicou que a planta *Baccharis dracunculifolia* possui uma atividade antioxidante importante. No presente trabalho foram investigados os efeitos protetores do extrato glicólico de *Baccharis dracunculifolia* contra o estresse oxidativo nas mitocôndrias isoladas de fígado de rato. Sugere ainda que a planta provavelmente apresenta efeitos hepatoprotetores. Os autores atribuem essa ação à alta concentração de fenóis e flavonoides que são substâncias conhecidas como potentes antioxidantes.

#### 1.4.1 BACCHARIS DRACUNCULIFOLIA

*Baccharis dracunculifolia*, popularmente conhecida como “alecrim do campo” ou vassourinha do campo, pode ser observada na figura 06, pertence à família *Asteraceae*. A família *Asteraceae*, também denominada *Compositae*, apresenta aproximadamente 23 mil espécies, que são agrupadas em 1535 gêneros e 17 tribos. Muitos estudos são desenvolvidos tendo como base a família citada, e seu interesse deve-se ao fato de que em sua composição química apresenta grande diversidade de metabólitos secundários, especialmente os flavonoides (VERDI *et al.* 2005; SFORCIN *et al.* 2012).

**Figura 06:** Arbusto da *Baccharis dracunculifolia* – Universidade Centro-Oeste, Campus CEDETEG



**Fonte:** Da autora (2014).

A tribo *Asteraceae* é composta por 500 espécies registradas. Sua maior concentração situa-se na América do Sul, especificamente no Brasil, Argentina, Uruguai e Paraguai. Só no Brasil, existem aproximadamente 120 tipos de espécies do gênero. É encontrada em maior quantidade nos estados de São Paulo, Minas Geras, Santa Catarina e Paraná. O gênero é classificado como arbusto e seu tamanho varia entre 0,5 a 4m de altura. O gênero *Baccharis* possui, em sua composição química, substâncias fenólicas, como flavonóides, além de triterpeno, diterpenos, especialmente clerodano e labidano (VERDI *et al.* 2005; SILVA FILHO, 2004).

Esse gênero apresenta diversas espécies, entre elas a planta *Baccharis dracunculifolia*. A espécie possui uma importância significativa do ponto de vista ecológico e medicinal, devido principalmente ao fato de ser a principal fonte botânica de própolis verde (VERDI *et al.* 2005; SILVA FILHO, 2004).

Estudos fitoquímicos demonstraram uma significativa concentração de compostos como fenilpropanoides drupanina, bacarina e artepilina C. Estudos com cromatografia líquida de alta eficiência evidenciaram a presença de flavonóides canferol, apigenina, isosacuranetina, pinocembrina, crisina, galangina e canferide, além de ácido cumárico e ácido ferúlico (SILVA FILHO, 2010).

Outros estudos com extrato de *Baccharis dracunculifolia* demonstraram a presença, no extrato, de germacreno-D e biciclogermacreno, assim como derivados prenilados do ácido coumarínico. Também encontraram compostos evidenciados são: Germacreno-D, biciclogermacreno, delta-cadineno, e germacrona; além de ácido 3,4-di-O-ácido-cafeoilquinico, ácido-3.5-di-O-cafeoilquinico e o ácido clorogênico. (MIDORIKAWA *et al.*, 2001 e LOAYZA *et al.*, 1995).

O estudo do *Baccharis dracunculifolia* tanto das folhas, quanto das raízes e dos brotos em diversas formas de manipulação – a citar o elaboração do extrato e de óleo essencial – é fundamental, pois algumas composições acima citadas são encontradas em própolis verde. Este possui propriedades antimicrobianas e anti-inflamatórias, sendo amplamente utilizado em tratamentos inflamatórios e hepáticos (SILVA FILHO, 2012).

As atividades anti-inflamatórias têm como função a recuperação de tecidos celulares danificados. O processo de inflamação de partes específicas do corpo em decorrência de inflamações e infecções gera dor e desconforto. Diversas plantas são utilizadas para auxiliar no processo de anti-inflamatório e minimização da dor. A *Baccharis dracunculifolia* apresenta significativa capacidade anti-inflamatória como se pode observar em estudos com própolis verde e em pesquisas com extrato *in vivo* (PAULINO *et al* 2008 e SILVA FILHO *et al* 2010).

Além dos tratamentos hepáticos e anti-inflamatórios, o *Baccharis dracunculifolia* demonstrou atividade tripanocida em estudo com *Trypanosoma*

cruzi (SILVA FILHO et al 2004), além de ação antitumoral em humanos como e células de carcinoma de laringe (BÚFALO et al 2009), em células fibrossarcoma e adenocarcinoma de pulmão (BASKOTA et al., 2002). O extrato etanólico de própolis verde também demonstrou eficácia em tratamento de úlceras induzidas (REIS, 2000) e ação antibacteriana (BASKOTA et al., 2001 e SILVA FILHO et al 2008).

## 1.5 MODELOS ANIMAIS PARA ESTUDO DE ESTRESSE CRÔNICO

Dias (2009) realizou um estudo de revisão de literatura sobre modelos animais e depressão humana. O autor utilizou a técnica de “data mining” e revisou 73 artigos indexados no PubMed ou ISI sobre o tema no período de 2008-2009. Os resultados demonstram que um número significativo de pesquisadores optam por estudos com modelos animais. Dentre os achados, observam-se correlações entre depressão, ansiedade e estresse. Além dessas correlações, pode-se perceber que o hipocampo é uma das principais áreas de estudo na depressão e suas comorbidades. O estudo demonstrou que o hipocampo apresenta uma redução de tamanho expressiva em ratos deprimidos e a maioria dos estudos atribuem esse fato à diminuição da neurogênese que pode ser revertida com uso de terapias específicas para tratamento da depressão.

O modelo de estresse crônico variado foi descrito pela primeira vez por Katz (1981). Posteriormente, Willner (1997) desenvolveu uma pesquisa sobre depressão e estresse crônico, na qual os estímulos eram menos aversivos. Neste experimento, os ratos foram submetidos a 40 dias de estresse. O autor sugeriu a alternância de estressores, pois constatou que, ao utilizar um único estressor, o animal tende a adaptação e portanto não apresenta a resposta esperada ao estímulo estressor. No modelo utilizado por Willner os estressores utilizados foram: inclinação da caixa-moradia, privação de alimento e restrição alimentar, privação de água, iluminação constante, barulho intermitente, não troca de maravalha, diminuição da temperatura, isolamento, odores desconhecidos e não agradáveis. Desde então, diversos estudos foram realizados com modelo de estresse crônico variado. O presente estudo foi desenvolvido utilizando adaptações de modelos de estresse crônico realizados pelos pesquisadores Santos (2013), Gamaro (2003) e Vasconcellos (2005).

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar os efeitos da administração do extrato de *Baccharis dracunculifolia* sobre parâmetros comportamentais, morfológicos e bioquímicos em ratos submetidos a um modelo de estresse crônico variado.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar os efeitos da administração do *extrato tipo tintura da Baccharis dracunculifolia* sobre a atividade locomotora e ansiedade de ratos submetidos a um modelo de estresse crônico variado.
- Avaliar os efeitos da administração do *extrato tipo tintura da Baccharis dracunculifolia* sobre o comportamento alimentar de ratos submetidos a um modelo de estresse crônico variado.
- Verificar os efeitos da administração do *extrato tipo tintura da Baccharis dracunculifolia* sobre a memória operacional e espacial de referência de ratos submetidos a um modelo de estresse crônico variado.
- Examinar os efeitos da administração do *extrato tipo tintura da Baccharis dracunculifolia* sobre parâmetros bioquímicos e anatômicos de ratos submetidos a um modelo de estresse crônico variado.
- Evidenciar os efeitos acima descritos por meio da curva de dose-efeito (100mg, 200mg e 400mg) do *extrato tipo tintura da Baccharis dracunculifolia*

O projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Uso de Animais (CEUA- UNICENTRO). O registro é 006/2014 – anexo 01.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Foram utilizados 60 ratos machos albinos da linhagem *Wistar (Rattus norvegicus albinus)* com 90 dias de idade, pesando entre 300-400g provenientes do biotério da Universidade Estadual de Maringá (UEM). Com exceção às atividades de estresse e tarefas comportamentais, os animais foram mantidos em suas caixas-moradias em base de polipropileno, autoclavável nas medidas de 41 x 34 x 16 cm, com assoalho recoberto com maravalha autoclavada. Foram aceitos no máximo 5 animais por caixa.

Os animais foram alojados em um local com temperatura controlada ( $26^{\circ}\pm 1$ ), ciclo claro-escuro de 12 horas, tratados com ração para roedores da marca QUINTIA. A água e ração foram fornecidas *ad libitum* durante todo o experimento (exceto para os animais dos grupos submetidos ao estresse crônico durante o período em que o estressor aplicado foi a privação de alimento). O consumo de água e ração foi registrado diariamente com o intuito de verificar o comportamento alimentar.

#### 3.2 DESENHO EXPERIMENTAL

A escolha dos sujeitos experimentais foi de delineamento inteiramente causalizado (DIC) e os animais foram divididos em 6 grupos experimentais, divididos em 5 animais por caixa experimental, constituídos da seguinte maneira:

- Controle total (Ct): 10 animais sem receber o modelo de estresse crônico variado (ECV).
- Controle *Baccharis dracunculifolia* (CBD): 10 animais sem receber o modelo de estresse crônico variado e tratados com o extrato.
- Estresse crônico (Ec): 10 animais recebendo o modelo de ECV e tratados com uma solução Tween 80.
- Estresse crônico + *Baccharis dracunculifolia* (Ec/BD - 100): 10 animais recebendo o modelo de ECV e tratados com *Baccharis dracunculifolia* 100mg/Kg.

- Estresse crônico + *Baccharis dracunculifolia* (Ec/BD - 200): 10 animais recebendo o modelo de ECV e tratados com *Baccharis dracunculifolia* 200mg/Kg.
- Estresse crônico + *Baccharis dracunculifolia* (Ec/BD - 400): 10 animais recebendo o modelo de ECV e tratados com *Baccharis dracunculifolia* 400mg/Kg.

Durante todo o experimento, incluindo o período de realização das atividades comportamentais, os animais foram submetidos a dosagens de *Baccharis dracunculifolia* ou solução Tween 80, dependendo do grupo experimental, por meio da técnica de gavagem. As dosagens foram administradas uma vez ao dia, sempre as 9 horas da manhã. Buscou-se evitar qualquer forma de estresse nos animais do grupo Ct, portanto, apenas nesse grupo, não foi realizado o procedimento de gavagem. Os grupos foram submetidos aos tratamentos nas seguintes dosagens:

- Grupo Ec: solução salina de 0,5ml contendo 0,5% de carboximetilcelulose (CMC) + água purificada q.s.p.
- Grupo CBC: solução de 0,8ml composta por 400mgKg de Extrato de *Baccharis dracunculifolia* + água purificada q.s.p.
- Grupo Ec/BD - 100: solução de 0,2ml contendo 100mg/Kg Extrato de *Baccharis dracunculifolia* + água purificada q.s.p.
- Grupo Ec/BD - 200: solução de 0,4ml contendo 200mg/Kg Extrato de *Baccharis dracunculifolia* + água purificada q.s.p.
- Grupo Ec/BD - 400: solução de 0,8ml contendo 400mg/Kg Extrato de *Baccharis dracunculifolia* + água purificada q.s.p.

**Figura 07:** Procedimento de gavagem.



**Fonte:** Da autora (2015).

### 3.3 EXTRATO DA *BACCHARIS DRACUNCULIFOLIA*

O processo de coleta da planta *Baccharis Dracunculifolia* ocorreu durante o mês de dezembro de 2014. Antes da coleta, uma amostra foi recolhida e encaminhada para o município de Curitiba, posteriormente depositada no Herbário MBM do Museu Botânico, localizado no Parque Jardim Botânico e recebeu o registro de número 388374. O registro encontra-se no anexo 02 do presente trabalho.

Optou-se pela coleta tipo quimiotaxonômica, também conhecida como coleta filogenética. Essa coleta tem por objetivo estudar componentes fitoquímicos de uma espécie (ALBUQUERQUE e HANAZAKI, 2006), no presente estudo a *Baccharis dracunculifolia*. Toda a amostra foi retirada da Universidade Estadual do Centro-Oeste, *campus* CEDETEG, localizado na Rua Camargo Varela de Sá, 03 – Vila Bela, Guarapuava – Paraná. As coordenadas geográficas são: Latitude Sul 25° 23' 36" e Longitude Oeste 51° 27' 19". A coleta foi realizada dia 08 de dezembro às 12h com temperatura média de 25°C.

Após a coleta a planta, optou-se pelo processo de secagem em estufa como demonstrado na figura 08, com temperatura controlada de 40°C. A secagem foi realizada por dois motivos fundamentais. O primeiro refere-se retirada da água que evita a proliferação microbiana e o segundo, para finalizar os processos metabólicos produzidos pelas folhas, mesmo depois da coleta (SIMÕES et al., 2010).

**Figura 08:** Estufa – Universidade Centro-Oeste, Campus CEDETEG.



**Fonte:** Da autora (2014).

Posteriormente ocorreu o desfolhamento que priorizou a seleção apenas das folhas que foram encaminhadas para o processo de moagem. A figura 09 demonstra o moinho utilizado no processo de elaboração do extrato. A moagem tem por objetivo aumentar as áreas de contato do material sólido (fragmentos da planta) com o líquido extrator, tornando o processo mais eficaz. (SIMÕES et al., 2010).

**Figura 09:** Moinho – Universidade Centro-Oeste, Campus CEDETEG



**Fonte:** Da autora (2014).

Posteriormente foi realizado o teste de umidade, que tem por finalidade verificar o nível de umidade residual da amostra. O método empregado foi de dessecação, descrito na Farmacopéia Brasileira (1988), partindo de 2 a 6g de amostra pesada em placa de petri. A amostra foi aquecida a 100°C durante 5h, após este período foi pesada novamente. O valor obtido entre a diferença das pesagens foi considerado o teor de umidade residual da amostra. O teste foi realizado em triplicata. Após o resultado do teste de umidade residual, pode-se adicionar o acetato de etila. As amostras foram elaboradas utilizando aproximadamente 50g das folhas moídas para cada 220mL de acetato de etila. O Processo de extração foi realizado por agitação e permaneceram no “shaker” por sete dias como pode-de perceber na figura 10.

**Figura10:** Shaker – Faculdade Campo Real.



**Fonte:** Da autora (2014).

A solução foi filtrada e evaporada inicialmente em rotaevaporador a uma temperatura controlada de 30°C, e em seguida, evaporada em temperatura ambiente de aproximadamente 25°C para retirada do solvente como pode ser observado nas figuras 11 e 12.

Figura 11 e 12: Processo de filtragem e rotaevaporador – Universidade Centro-Oeste, Campus.



**Fonte:** Da autora (2014).



Após esta operação, o extrato foi diluído em solução de "Tween 80" (veículo) e água destilada, na proporção 1/8 para só então ser administrado. O extrato foi mantido em refrigeração em temperatura de 7°C durante do o tempo de uso.

### 3.4 MODELO DE ESTRESSE CRÔNICO VARIADO

Para induzir os sujeitos experimentais ao estresse crônico variado, foi utilizado um modelo adaptado dos pesquisadores Santos (2013), Gamaro *et al.* (2003) e Vasconcellos *et al.* (2003) Vasconcellos *et al.* (2005). Como mencionado anteriormente, os grupos Ct e CBD não receberam estímulos estressores e, durante todo o experimento, permaneceram em caixas-moradia e receberam cuidados referentes a água e ração *ad libitum* e troca de maravalha, quando não relacionada ao estímulo estressor.

Foram utilizados sete estressores dispostos da seguinte forma:

- a) Exposição ao frio (1 hora)
- b) Imobilização (1-2 horas)
- c) Inclinação da caixa-moradia em um ângulo aproximado de 45° (2-5 horas)
- d) Luz intermitente (1-2 horas)
- e) Privação de alimento (24 horas)
- f) Nado forçado (15 minutos)
- g) Ausência de troca de maravalha (48 horas)

Durante quarenta dias os sujeitos experimentais foram submetidos a um dos sete tipos de estressores acima descritos. Os estressores foram aplicados diariamente em horários e períodos diferentes, para evitar o efeito de previsibilidade ao estressor. Essa técnica é descrita por autores como Santos, (2013) e Vasconcellos *et al.*, (2005). Os estressores foram descritos detalhadamente a seguir.

Para a realização da exposição ao frio, foi utilizada uma câmara fria com a temperatura controlada de 5 a 7°C. O tempo médio para esse estressor foi de aproximadamente uma hora. No processo de imobilização, os animais foram inseridos no interior de garrafas de refrigerante *Pet* de 600 ml. As garrafas foram cortadas no fundo para que a calda do animal fosse preservada. Os animais foram cuidadosamente inseridos no interior da garrafa *pet* (figura 13) para que não houvesse desconforto físico. Assim, a imobilização foi realizada durante aproximadamente uma hora e durante esse tempo os

animais foram impossibilitados de se locomover, porém tiveram movimentos respiratórios sem qualquer obstrução.

**Figura 13:** Estressor de imobilização.



**Fonte:** Da autora (2015).

Para aplicar o estressor por inclinação, abaixo da caixa-moradia foi inserido um tijolo (figura 14). As caixas-moradia foram inclinadas por tempo aproximado de duas a quatro horas.

**Figura 14:** Estressor de inclinação da caixa-moradia.



**Fonte:** Da autora (2015).

O estressor relacionado à maravalha foi realizado da seguinte forma: os animais foram mantidos em caixas-moradia sem a respectiva troca por aproximadamente 48 horas. No que se refere ao estressor tipo nado forçado, os animais foram inseridos cuidadosamente em uma caixa com água em temperatura controlada de aproximadamente 25°C. O objetivo deste estressor foi manter nos animais em atividade de natação por 15 minutos (figura 15).

**Figura 15:** Estressor de Nado forçado.



**Fonte:** Da autora (2015).

Já o estressor provocado por luz intermitente foi realizado do seguinte modo: 4 lâmpadas tipo pisca-pisca de 15 watts foram inseridas no interior das caixas-moradia por um período aproximado de uma hora. Abaixo segue o calendário demonstrativo dos estressores utilizados durante os quarenta dias aos quais os animais foram submetidos.

Tabela 01 – Calendário demonstrativo dos estressores utilizados, sequência e duração.

<b>Dia</b>	<b>Estressor utilizado</b>	<b>Duração</b>
1	Nado forçado	5 hora
2	Privação de alimento	24 horas
3	Luz intermitente	1 hora
4	Inclinação da caixa-moradia	2 horas
5	Ausência de troca de maravalha	48 horas
6	Privação de alimento	24 horas
7	Imobilização	30 minutos
8	Exposição ao frio	1 hora
9	Nado forçado	7 minutos
10	Luz intermitente	2 horas
11	Inclinação da caixa-moradia	2 horas
12	Imobilização	1 hora
13	Nenhum estressor aplicado	---
14	Privação de alimento	24 horas
15	Ausência de troca de maravalha	48 horas
16	Nado Forçado	10 minutos
17	Luz intermitente	2 horas
18	Inclinação da caixa-moradia	2 horas
19	Privação de alimento	24 horas
20	Ausência de troca de maravalha	48 horas
21	Luz intermitente	2 horas
22	Imobilização	1 hora
23	Nado Forçado	12 minutos
24	Luz intermitente	2 horas
25	Privação de alimento	24 horas
26	Ausência de troca de maravalha	48 horas
27	Inclinação da caixa-moradia	3 horas
28	Exposição ao frio	1 hora
29	Imobilização	1,5 horas
30	Nado Forçado	15 minutos
31	Inclinação da caixa-moradia	4 horas
32	Privação de alimento	24h
33	Nenhum estressor aplicado	----
34	Ausência de troca de maravalha	48 horas
35	Exposição ao frio	1 hora
36	Imobilização	2 horas
37	Nado Forçado	15 minutos
38	Luz intermitente	2 horas
39	Inclinação da caixa-moradia	4 horas
40	Ausência de troca de maravalha	48 horas

Fonte: Adaptado Santos (2013).

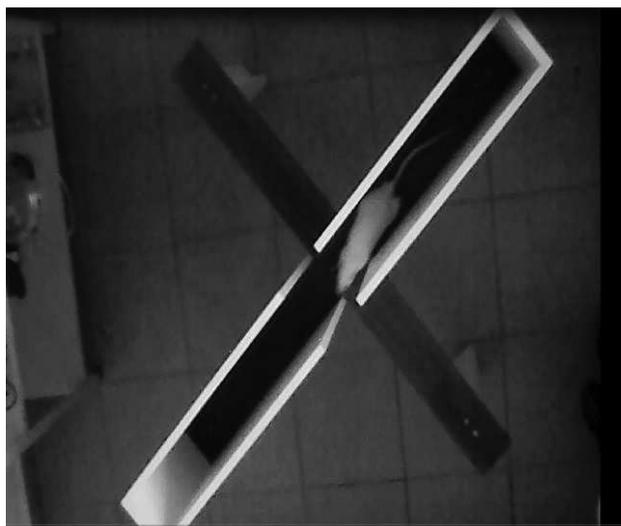
### 3.5 PARÂMETROS COMPORTAMENTAIS

Todos os animais, 24 horas após a 40ª sessão de estresse, foram submetidos a testes comportamentais que têm como função investigar memória espacial, comportamento alimentar, atividade locomotora e ansiedade. Na sequência, serão descritos os testes comportamentais utilizados, funções e formas de aplicação.

#### 3.5.1 LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO

O labirinto em cruz elevado, como demonstra a figura 16, foi constituído de madeira, possui 50 cm de altura do chão e é composto por 4 braços – com medidas de 50 x 10 cm – sendo 2 abertos (BAs) e 2 fechados (BFs) e uma arena central de 10 x 10 cm no cruzamento entre os braços.

**Figura 16:** Labirinto em cruz elevado, imagem rato 01 do grupo controle total.



**Fonte:** Da autora (2015).

Esse equipamento foi desenvolvido por Pellow et al. (1985) e tem como objetivo investigar a ansiedade manifestada pelos sujeitos experimentais tipo roedores. Utilizando metodologia semelhante a Santos (2013), no 41º dia de experimento, cada animal foi colocado na arena central com a cabeça voltada para um dos BFs e foi deixado que ele explorasse o equipamento por um período de 5 minutos.

Após o tempo de ambientação, foram mensurados:

a) O número de entradas e tempo de permanência nos BAs;

- b) O número de entradas e tempo de permanência nos BFs;
- c) A porcentagem (%) de entradas nos BAs. O cálculo utilizado foi:  $n^{\circ}$  de entradas nos BAs / [ $n^{\circ}$  de entradas nos BAs + entradas nos BFs] x 100)
- d) A porcentagem (%) de tempo transcorrido nos BAs (tempo de permanência no BAs / [no tempo de permanecia nos BAs + tempo de permanência nos BFs] x 100) (SANTOS, 2013).

### 3.5.2 CAMPO ABERTO

O campo aberto, também conhecido como *Open Field*, tem por objetivo investigar a atividade locomotora exploratória em sujeitos experimentais, sendo utilizada usualmente com ratos. A atividade locomotora exploratória sofre influência de fatores emocionais, por esse motivo é interessante sua utilização em atividades que investigam ansiedade, depressão e estresse em roedores.

O Campo aberto como demonstra a figura 17, consiste em uma caixa arredondada de material acrílico com base divisória em formato de campo. A base possui 100 cm x 100 cm, sendo dividida em 12 quadrantes. As dimensões do aparelho são: 50 cm de altura por 90 cm de diâmetro. Por ser de material acrílico, o open field permite total visualização do comportamento do animal. No 42º dia de experimento, cada animal foi gentilmente inserido no campo aberto, especificamente em um quadrante com olhar voltado ao piso. O objetivo foi de deixar o animal explorar o ambiente por um período de 5 minutos. Como critério de avaliação da atividade locomotora foi observado o número de quadrantes percorridos pelo animal.

**Figura 17:** Open Field, imagem rato 01 do grupo controle total.



**Fonte:** Da autora (2015).

### 3.5.3 MAPEAMENTO DE COMPORTAMENTO ALIMENTAR

Para Gamaro et al. (2003a) o padrão alimentar é alterado em função do estresse. Alguns estudos relatam que ratos estressados podem apresentar uma diminuição do consumo de alimentos doces, a hipótese sugerida é a anedonia, um sintoma muito presente na depressão. (BAGUL P. *et al.*, 2012). Outros estudos como o de Yau e Potenza (2013) que demonstram um aumento no consumo de doces.

A tarefa de comportamento alimentar foi iniciada no 43º dia e foi finalizada no 48º dia. Nos primeiros cinco dias da atividade, os animais foram cuidadosamente inseridos em uma caixa-moradia contendo alimentos doces na parte superior da mesma. Para incentivá-los a ingerir alimentos doces, os animais foram submetidos a restrição alimentar. Os doces utilizados foram roscas de trigo, amido e sacarose denominados *pellets* do cereal Froot Loops® da marca *Kellongs*®. Durante os cinco dias de atividade para a habituação os animais foram submetidos a sessões diárias de 3 minutos em contato com os *pellets*. No 48º dia foi realizado o teste para investigação de comportamento alimentar. A sessão teve a mesma duração dos dias de habituação, ou seja, três minutos. No entanto, diferentemente dos dias de ambientação, não houve restrição alimentar. Foi avaliado a quantidades de *pellets* consumidos no período.

A tarefa de comportamento alimentar é amplamente utilizada para investigar comportamento depressivo em ratos. Os animais que apresentam comportamento anedônico, isto é, redução de interesse e prazer nas atividades, durante a tarefa de comportamento alimentar tendem a reduzir significativamente a quantidade de alimentos doces (GARCIA-DIAZ, 2011). Existem diversos modelos para investigar o comportamento alimentar. O modelo utilizado no presente estudo foi baseado nos estudos de Santos (2013) e Gamaro (2003).

### 3.5.4 LABIRINTO DE OITO BRAÇOS

O labirinto octagonal (LO), denominado também de labirinto radial de 8 braços, como observado na figura 18, possui uma plataforma central de 20 centímetros de diâmetro. A esta plataforma, ligam-se 8 braços, cada um com

180 mm de altura, 109 de largura e 470mm de comprimento. O aparelho é monitorado por sensores e as portas são acionadas por motor elétrico.

**Figura 18:** Labirinto de oito braços, imagem rato 01 do grupo controle total.



**Fonte:** Da autora (2015).

Para iniciar as atividades os animais foram submetidos a restrição alimentar. A tarefa foi composta por dez dias de treinamento. No primeiro dia foram realizadas três sessões com intervalo de cinco minutos. Em cada sessão foram inseridos *pellets* no final de cada braço. O animal era cuidadosamente inserido na plataforma central e a sessão era finalizada após a ingestão de todos os *pellets*. Após o encerramento da fase de treino, ao retornar a caixa-moradia, a ração foi disponibilizada *ad libitum*. Nas sessões dos dias subsequentes os pellets foram inseridos apenas nos braços 3,5,6,8. A fim de investigar o processo de memória operacional e de longa duração, os animais permaneceram 15 dias sem realizar atividade no LO. Apenas no 25º dia os animais foram novamente submetidos ao LO, em três sessões de cinco minutos. Os pellets foram colocados novamente nos braços 3,5,6,8. Foram monitorados os movimentos, acerto e erros, sendo considerados dois tipos de erros: entrada nos braços que não haviam *pellets* e entradas repetidas.

O desenvolvimento do protocolo foi uma adaptação do estudo de Cai *et al* (2010).

### 3.6 CONSUMO DE RAÇÃO, INGESTÃO DE ÁGUA E PESO CORPORAL

Outros parâmetros de investigação do comportamento alimentar foram a mensuração do consumo de ração e água e o peso corporal dos animais. Para a investigação desses parâmetros, diariamente foram registrados o consumo de ração e água por caixa-moradia. Posteriormente estes valores foram divididos pelo número de habitantes da caixa avaliada. Diariamente foram realizadas as medidas de consumo das caixas e conseqüentemente de casa sujeito experimental. O peso corporal foi avaliado semanalmente durante todo o período de submissão ao estresse. Ao final do experimento, ou seja, logo após a realização da última tarefa comportamental, os animais foram novamente pesados, afim de obter o índice de Lee [razão da raiz cubica de massa corporal (peso) dividido pelo comprimento naso anal (mensurado em centímetros e multiplicado por 10)]. Esse índice semelhante ao índice de massa corporal IMC (ARAUJO *et al*, 2009).

Devido ao estressor privação de alimento, nos dias de privação e dia sucessor à esse estressor, não foram mensurados o consumo de alimento e água (SANTOS, 2013 e GAMARO, 2003).

### 3.7 PARÂMETROS MOROFÓDICOS E BIOQUÍMICOS

#### 3.7.1 DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS MORFOLÓGICOS

No dia que sucedeu à última sessão os animais foram submetidos a 12 horas de jejum e posteriormente foram eutanasiados pela técnica de deslocamento cervical, guilhotina. Após eutanásia foi mensurado o peso referente ao tecido adiposo (gordura das regiões mesentérica, retroperitoneal e periepididimal), coração, rim e adrenal esquerda. Os dados foram expressos em g de tecido por 100g de peso corporal (g/100g).

Foram coletadas a glândula adrenal direita, coração, cérebro (hemisfério esquerdo e hipocampo direito). Estas amostras foram pesadas e avaliadas macroscopicamente. Em seguida foram adicionadas em formaldeído 10% (v/v) visando análise histopatológica. Os fragmentos foram processados de acordo com as técnicas de rotina para inclusão em blocos de parafina,

cortadas em micrótomo a 3-4 micrômetros e corados pela técnica da Hematoxilina-Eosina (H.E.). Os órgãos descrito, serão avaliados quanto à presença ou não de alterações histopatológicas.

O peso do coração foi utilizado para o cálculo do índice de hipertrofia cardíaca (IHC), expresso pela seguinte relação: peso do coração (mg) / peso do animal (g) (WALLEN et al., 2000).

### 3.7.2 DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS

O sangue foi coletado e inserido em tubos plásticos (sem reagentes para soro e com fluoreto para plasma) e após centrifugação de 2000 rpm por 5 minutos foi retirado o soro para análise bioquímica referentes à corticosterona, triglicerídios, colesterol total e glicose. Para investigação dos níveis de triglicerídios, glicose e colesterol foi utilizado o método enzimático e calorimétrico (reação de Trinder) – Kit comercial LABTEST®. Os resultados foram expressos em mg/dL. A corticosterona foi determinada por quimioluminescência e os resultados foram expressos em µg/dL.

Tabela 02 – Esquema geral das atividades que foram desenvolvidas

<b>Ordem</b>	<b>Atividade</b>	<b>Duração</b>
1	Exposição aos estressores	40 dias
2	Labirinto em cruz elevado	1 dia
3	Campo aberto	1 dia
4	Tarefa de comportamento alimentar	6 dias
5	Labirinto de oito braços	25 dias
6	Eutanásia, coleta de sangue e órgãos	2 dia

Fonte: adaptado Santos (2013).

### 3.8 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Em um primeiro momento foi realizada análise descritiva dos dados, apresentadas em média ± erro padrão (EPM). Posteriormente as médias foram comparadas utilizando ANOVA para medidas repetidas como ganho de peso e consumo de ração e água e seguidos de *post hoc* de Student-Newman-Keuls (SNK). A análise foi desenvolvida por meio do software estatístico Statistical Package for the Social Sciences - SPSS versão 17.0.

## 4. RESULTADOS

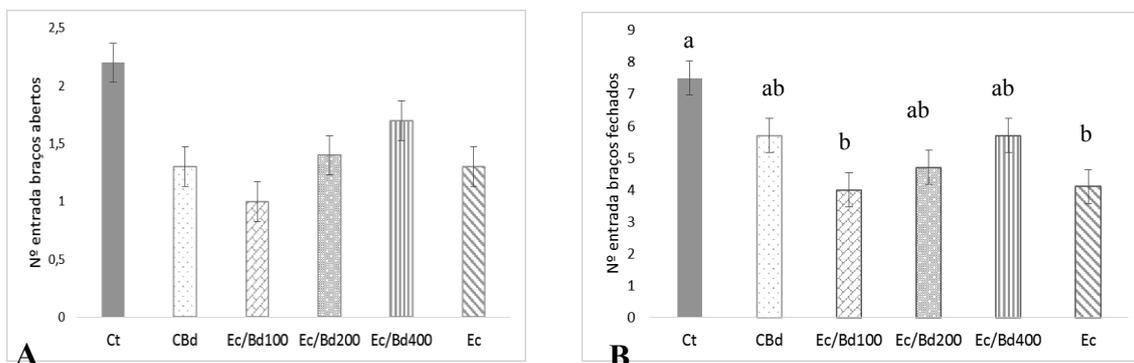
### 4.1 PARÂMETROS COMPORTAMENTAIS

Durante todo o experimento não foram observadas alterações clínicas nos animais do grupo Ct e no grupo CBd, no entanto alguns animais submetidos ao estresse apresentaram problemas respiratórios e um animal desenvolveu tricotilomania. A tricotilomania é um comportamento anormal desenvolvido tanto em animais e humanos e consiste em arrancar os próprios pelos. É vinculado a este comportamento o transtorno obsessivo compulsivo e pode ser desencadeado por estresse (DINIZ *et al*, 2012)

#### 4.1.1 LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO

Foram analisados os números de entradas tanto nos braços abertos (BAs) e quanto nos braços fechados (BFs). Também foi avaliado o tempo de permanência em cada braço. Os resultados demonstram que não há diferença significativa entre o número de entradas nos BAs. No que se refere a entrada nos BFs, pode-se verificar um aumento significativo de entradas no grupo controle total (Ct), quando comparado com os demais grupos. Embora o grupo Ct tenha entrado mais vezes nos BF's que os demais grupos, o tempo médio de permanência nos BF's foi expressivo no grupo Ec. Pode-se observar que o grupo Ec não explorou o ambiente, isto é, locomoveram-se menos e conseqüentemente passaram mais tempo em determinado um único braço durante todo o tempo destinado a realização da atividade.

Gráficos 01: Número de entrada nos BAs (A) e número de entradas nos BFs (B).

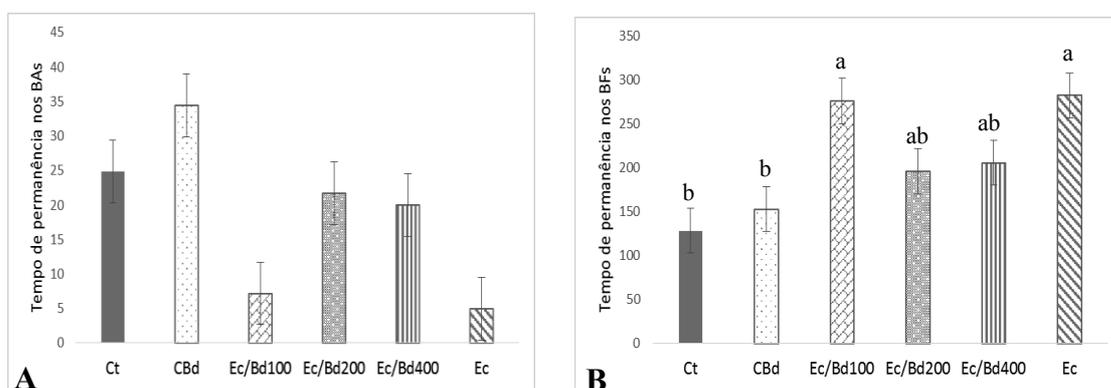


Os dados são apresentados em médias e  $\pm$  e.p.m. O gráfico acima indica que não há diferenças estatísticas de  $p < 0,05$ , usando ANOVA associada a *post hoc* de SNK. Foi utilizado a

letra a referenciar o maior número de entradas nos braços fechados, neste caso, a representa o Ct, ab para os grupos intermediários e b grupos com o menor número de entradas nos braços fechados.

Além dos números de entradas tanto nos braços abertos (BAs) e quanto nos braços fechados (BFs), foi analisado também o tempo de permanência em cada braço. Os resultados demonstram que não há diferença significativa o tempo de permanência nos BAs, muito embora a média de tempo do grupo de estresse crônico (Ec) tenha sido 5'' para 24,80'' do grupo controle total (Ct). No entanto, o tempo de permanência nos braços fechados foi significativamente maior no grupo de Ec quando comparado com os demais grupos.

Gráficos 02: Permanência nos BAs (A) e permanência nos BFs (B).



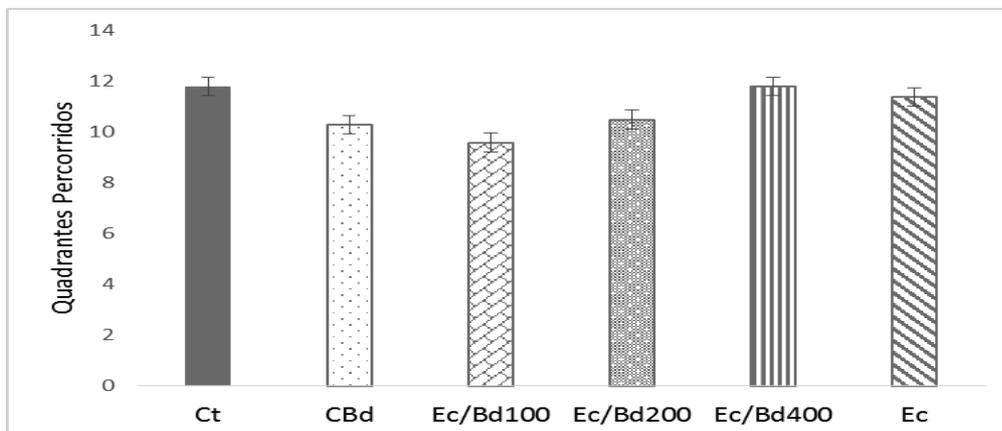
Os dados são apresentados em médias e  $\pm$  e.p.m. O gráfico acima indicam que não há diferenças estatísticas de  $p < 0,05$ , usando ANOVA associada a *post hoc* de SNK no gráfico A. No entanto, o gráfico B demonstra diferença estatística de  $p < 0,01$ , usando ANOVA associada a *post hoc* de SNK. Foi utilizada a letra a referenciar maior permanência nos braços fechados, ab para os grupos intermediários e b grupos com menor permanência nos braços fechados.

#### 4.1.2 OPEN FIELD

O teste tem por objetivo verificar a atividade locomotora dos animais. Foram analisados, portanto o número de quadrantes percorridos e os comportamentos associados. Os resultados demonstram que não há diferença significativa entre o número de quadrantes percorridos nos grupos analisados. Sobre os comportamentos associados, foram observados: levantar, cheirar, limpar, defecar, coçar e fuga. Apenas o comportamento de fuga obteve diferença significativa sendo o grupo CBd o que apresentou o maior número de

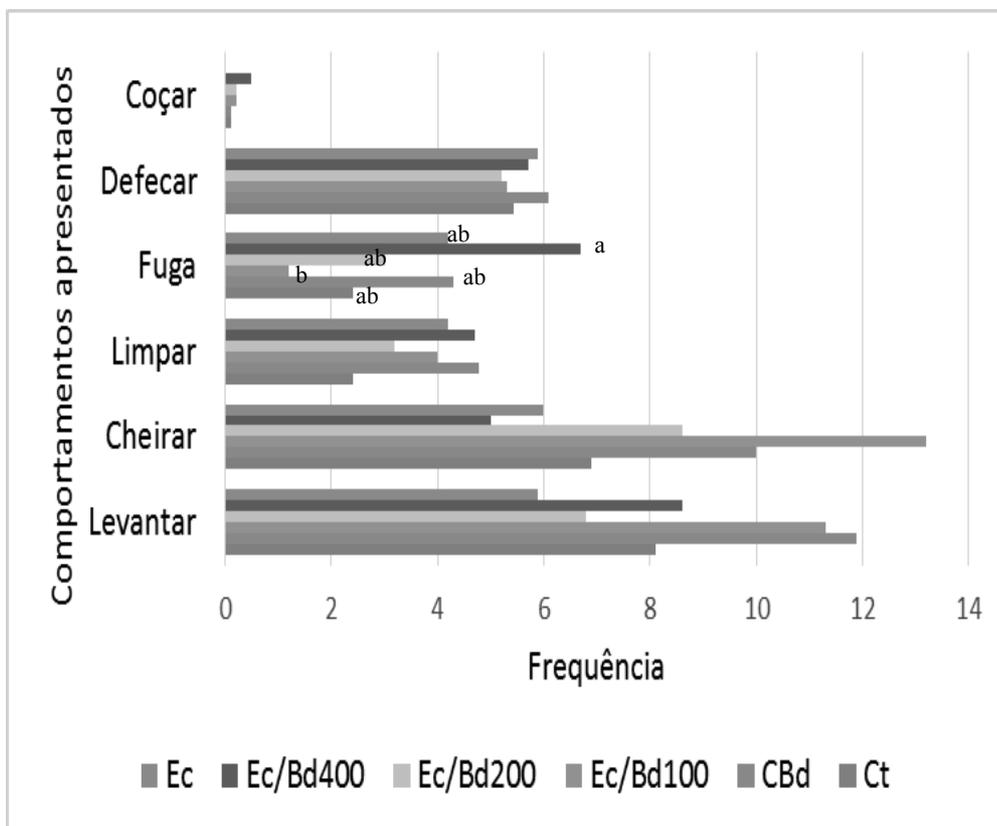
tentativas e o grupo Ec/Bd100 o menor número de tentativas. Os gráficos abaixo demonstram os resultados mencionados.

Gráfico 03: Quadrantes percorridos na tarefa Open Field.



Os dados são apresentados em médias e  $\pm$  e.p.m. O gráfico acima indica que não houve diferenças estatísticas de  $p < 0,05$ , usando ANOVA associada a *post hoc* de SNK.

Gráfico 04: Comportamentos associados na tarefa de Open Field.



Os dados são apresentados em médias e  $\pm$  e.p.m. O gráfico acima indica que não há diferenças estatísticas de  $p < 0,05$ , usando ANOVA associada a *post hoc* de SNK. Foi utilizada a letra a referenciar a maior frequência de tentativas de fuga, ab para os grupos intermediários e b grupos com o menor frequência de tentativas de fuga.

### 4.1.3 COMPORTAMENTO ALIMENTAR

Os resultados da pesquisa demonstraram que do primeiro ao terceiro dia de treinamento da tarefa de comportamento alimentar, os grupos submetidos ao estresse consumiram mais alimentos doces do que os grupos controle.

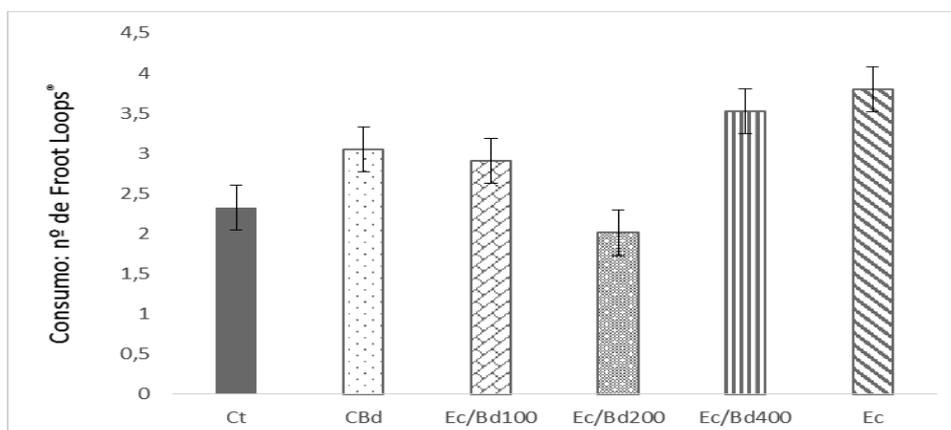
Tabela 03 – Média e desvio padrão de Comportamento alimentar.

	1º Dia	2º Dia	3º Dia	4º Dia	5º Dia	Teste
Ct	0,44±0,45 <sup>ab</sup>	1,00±0,86 <sup>b</sup>	1,85±1,08 <sup>b</sup>	2,70±1,70	2,32±1,66	2,32±1,10
CBd	0,65±0,68 <sup>b</sup>	1,25±1,22 <sup>b</sup>	1,3±0,98 <sup>ab</sup>	2,93±1,75	3,05±0,55	3,05±0,97
Ec/Bd100	1,34±1,28 <sup>ab</sup>	1,57±1,26 <sup>ab</sup>	1,33±0,42 <sup>ab</sup>	2,95±2,86	2,91±1,84	2,91±1,76
Ec/Bd200	0,58±0,51 <sup>ab</sup>	1,30±1,24 <sup>b</sup>	1,90±1,44 <sup>b</sup>	2,08±2,72	2,01±1,76	2,01±1,61
Ec/Bd400	1,63±0,64 <sup>b</sup>	2,60±1,21 <sup>a</sup>	3,35±1,14 <sup>a</sup>	3,08±1,67	3,53±1,31	3,53±1,52
Ec	1,43±0,92 <sup>ab</sup>	2,05±1,01 <sup>ab</sup>	3,25±0,81 <sup>a</sup>	3,48±0,94	3,80±0,71	3,80±0,40

Os dados são apresentados em médias e  $\pm$  e.p.m. A tabela acima indica que há diferença estatísticas de  $p < 0,05$  usando ANOVA associada a *post hoc* de SNK no 1º e 2º e 3º dia comparação. Foi utilizada a letra a referenciar o maior consumo de *Froot Loops*, ab para os grupos intermediários e b para menor consumo de *Froot Loops*.

Não houve resultado significativamente diferente no dia do teste, embora os animais do grupo Ec terem ingerido mais cereal *Froot Loops*® durante todos dos dias do experimento e também no dia do teste.

Gráfico 05: Tarefa de comportamento alimentar – Dia do teste.



Os dados são apresentados em médias e  $\pm$  e.p.m. No entanto, o gráfico demonstra que não houve diferença estatística de  $p < 0,05$ , usando ANOVA associada a *post hoc* de SNK no padrão alimentar no dia do teste.

#### 4.1.4 LABIRINTO OCTOGONAL

Os resultados demonstraram que apenas do 1º ao 5º dia houve diferença no número de acertos dos braços que contiam reforço. Os dados demonstram menor número de acertos do Ct e maior número de acertos do Ec. A primeira tabela dscreve os valores obtidos. A segunda tabela demonstra o número de entradas nos braços sem reforço. Apenas no 3º, 5º 6º e 7º demonstraram diferenças, sendo o grupo Ec o que cometeu o maior número de erros e os grupos CBD, Ec/BD200 e Ec/BD100 o que cometeram a menor taxa de erros.

Tabela 04 – Média e desvio padrão dos acertos significativos demonstrados ocorridos no Labirinto Octogonal.

	AC1	AC2	AC3	AC4	AC5
<b>Ct</b>	10,9± 1,7 <sup>a</sup>	9,2± 2,4 <sup>ab</sup>	9,4± 3,2 <sup>ab</sup>	10,4±2,7 <sup>ab</sup>	11,7±0,7 <sup>a</sup>
<b>BDC</b>	9,1± 4,0 <sup>ab</sup>	7,4± 4,0 <sup>b</sup>	6,0± 5,3 <sup>b</sup>	7,2± 5,5 <sup>b</sup>	7,3± 4,9 <sup>b</sup>
<b>Ec/BD100</b>	6,4± 4,4 <sup>b</sup>	8,3± 4,5 <sup>ab</sup>	8,6± 4,8 <sup>ab</sup>	8,3± 3,7 <sup>ab</sup>	3,7± 2,3 <sup>ab</sup>
<b>Ec/BD200</b>	7,1± 4,2 <sup>b</sup>	8,9± 3,9 <sup>ab</sup>	9,0± 4,9 <sup>ab</sup>	9,3± 5,3 <sup>ab</sup>	10,2±6,6 <sup>ab</sup>
<b>Ec/BD400</b>	10,2±3,0 <sup>ab</sup>	11,3±1,3 <sup>ab</sup>	11,0±1,5 <sup>a</sup>	11,8±0,7 <sup>b</sup>	11,9±5,4 <sup>a</sup>
<b>Ec</b>	11,2±1,0 <sup>a</sup>	12,0±0,0 <sup>a</sup>	11,9±0,3 <sup>a</sup>	11,8±0,4 <sup>b</sup>	13,2±5,2 <sup>a</sup>

Os dados são apresentados em médias e  $\pm$  e.p.m. A tabela acima indica que há diferença estatísticas de  $p < 0,05$  usando ANOVA associada a *post hoc* de SNK. Foi utilizada a letra a referenciar a maior média de acertos, ab para os grupos intermediários e b para menor média de acertos.

Tabela 05 – Média e desvio padrão significativos referente à entradas em braços que não haviam *Froot Loops* ocorridos no Labirinto Octogonal.

	EBS3	EBS5	EBS6	EBS7
<b>Ct</b>	11,3±4,5 <sup>ab</sup>	13,2±3,8 <sup>a</sup>	14,2±7,7 <sup>a</sup>	13,4±4,8 <sup>ab</sup>
<b>BDC</b>	6,7± 5,7 <sup>b</sup>	6,4±4,5 <sup>b</sup>	9,1± 4,1 <sup>ab</sup>	9,8±3,2 <sup>ab</sup>
<b>Ec/BD100</b>	11,0±5,7 <sup>ab</sup>	8,8± 3,5 <sup>ab</sup>	8,6± 5,4 <sup>b</sup>	8,0±6,1 <sup>b</sup>
<b>Ec/BD200</b>	9,4± 5,4 <sup>ab</sup>	9,8± 4,4 <sup>ab</sup>	7,7± 4,8 <sup>ab</sup>	7,8±4,1 <sup>b</sup>
<b>Ec/BD400</b>	11,3±3,4 <sup>ab</sup>	12,0±0,0 <sup>ab</sup>	10,4± 1,9 <sup>ab</sup>	12,4±2,9 <sup>ab</sup>
<b>Ec</b>	13,4±2,7 <sup>a</sup>	11,8±0,7 <sup>a</sup>	15,8±11,4 <sup>a</sup>	11,0±3,0 <sup>a</sup>

Os dados são apresentados em médias e  $\pm$  e.p.m. A tabela acima indica que há diferença estatísticas de  $p < 0,05$  usando ANOVA associada a *post hoc* de SNK. Foi utilizada a letra a referenciar a maior quantidade de erros, ab para os grupos intermediários e b para menor quantidade de erros.

#### 4.2 PARÂMETROS MORFOLÓGICOS

No que se refere ao padrão morfológico, foram pesados os seguintes órgão (g/100g): rim esquerdo (RE), rim direito (RD) e coração (COR). Também foram mensuradas as gorduras (g/100g): mesentérica (MES), retroperitoneal (RET) e peripididimal (PER). Os resultados indicam diferenças entre o peso do coração, sendo o grupo controle significativamente maior quando comparado com os demais grupos. Há também diferenças entre os níveis de gordura mesentérica e peripididimal. O grupo Ec obteve níveis de gordura retroperitoneal significativamente menor que os demais grupos. O grupo de Cbc apresentou níveis menores de gordura peripididimal, seguido dos grupos Ec e Ec/Bd 200.

Tabela 06: Parâmetros morfológico – rim esquerdo (RE), rim direito (rd), coração (COR), gordura mesentérica (MES), retroperitoneal (RET) e peripididimal (PER).

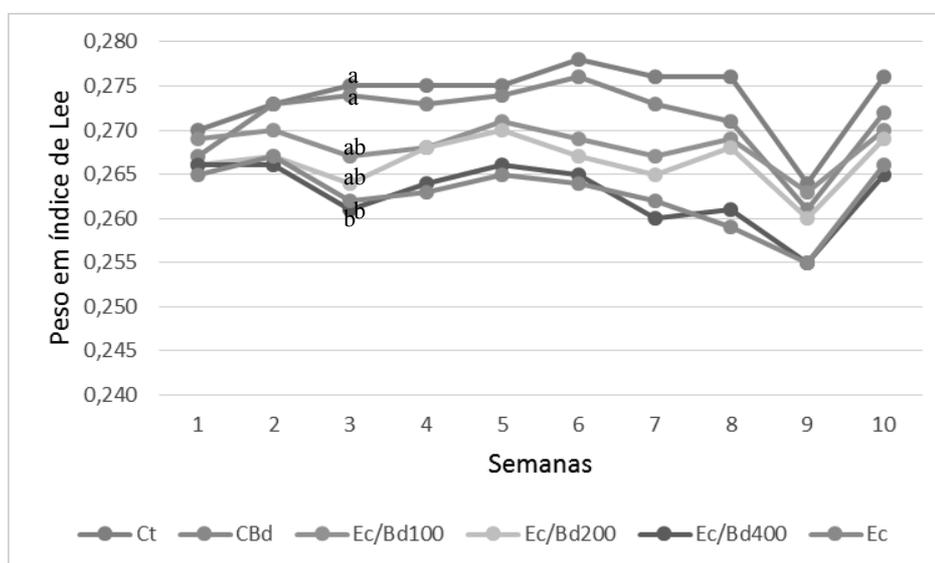
	<b>Ct</b>	<b>Cbc</b>	<b>Ec</b>	<b>Ec/Bd100</b>	<b>Ec/Bd200</b>	<b>Ec/Bd400</b>
<b>RE</b>	1,58±0,17	1,64±0,23	1,42±0,26	1,51±0,20	1,53±0,20	1,54±0,32
<b>RD</b>	1,69±0,23	1,64±0,28	1,45±0,31	1,51±0,23	1,54±0,19	1,59±0,32
<b>COR</b>	2,03±0,41 <sup>b</sup>	1,82±0,34 <sup>ab</sup>	1,75±0,30 <sup>ab</sup>	1,75±0,35 <sup>ab</sup>	1,92±0,42 <sup>ab</sup>	1,63±0,27 <sup>a</sup>
<b>MÊS</b>	5,03±1,36	5,92±1,73	5,56±0,21	5,15±1,24	5,73±1,14	6,16±1,40
<b>RET</b>	5,74±2,24 <sup>ab</sup>	4,81±1,13 <sup>ab</sup>	3,68±1,52 <sup>b</sup>	5,19±1,47 <sup>ab</sup>	5,93±2,23 <sup>a</sup>	5,36±0,93 <sup>ab</sup>
<b>PER</b>	6,34±1,66 <sup>b</sup>	4,76±0,88 <sup>ab</sup>	5,41±1,66 <sup>ab</sup>	6,25±3,68 <sup>b</sup>	5,70±1,56 <sup>ab</sup>	6,85±0,95 <sup>a</sup>

Os dados são apresentados em médias e  $\pm$  e.p.m. A tabela acima indica que não há diferenças no peso dos seguintes órgãos: rim esquerdo, rim direito e gordura mesentérica. No entanto, a tabela demonstra diferença estatística de  $p < 0,05$ , usando ANOVA associada a *post hoc* de SNK para o peso do coração, e de  $p < 0,01$  gordura retroperitoneal e peripididimal. Foi utilizada a letra a referenciar o maior peso, ab para os grupos intermediários e b para o menor peso.

#### 4.2.1 CONTROLE DE PESO SEMANAL

O peso dos animais foram mensurados semanalmente e transformados em índice de Lee [razão cubica de massa corporal (peso) dividido pelo comprimento naso anal (mensurado em centímetros e multiplicado por 10)]. Os resultados demonstraram que os animais durante as duas primeira semanas do experimento apresentaram pesos semelhantes. No entanto, a terceira, quarta, sexta, sétima e oitava semana, os grupos submetidos ao estresse crônico tiveram uma redução no peso. Os grupos Ec e Ec/Bd400 foram obtiveram redução significativa de peso durante todo o experimento.

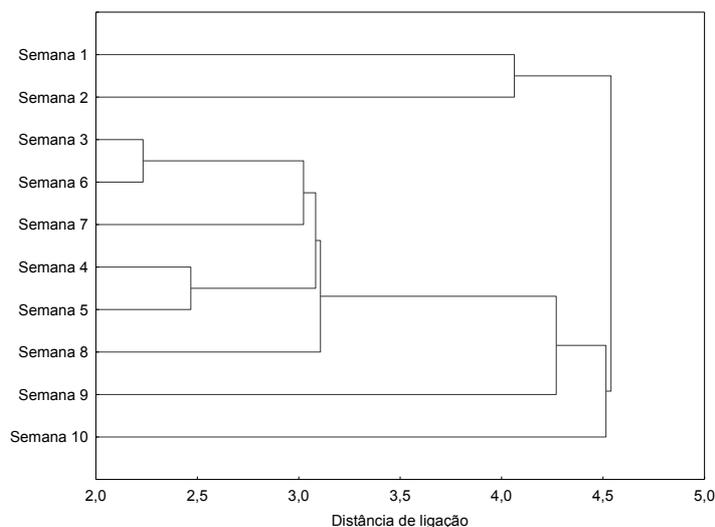
Gráfico 06: Parâmetros morfológico – controle de peso semanal.



Os dados são apresentados em médias e  $\pm$  e.p.m. O gráfico acima indica as diferenças estatísticas de  $p < 0,01$ , usando ANOVA associada a *post hoc* de SNK no que se refere ao índice de Lee nas: 3<sup>a</sup> 4<sup>a</sup> 6<sup>a</sup> 7<sup>a</sup> 8<sup>a</sup> semanas respectivamente. Foi utilizada a letra a referenciar o grupo com maior média de peso, ab para os grupos intermediários e b para o grupo com menor média de peso.

Durante a 3<sup>a</sup>, 4<sup>a</sup> 6<sup>a</sup>, 7<sup>a</sup> e 8<sup>a</sup> semana, os grupos submetidos ao estresse crônico tiveram uma redução no peso, os resultados mais expressivos foram encontrados nos grupos Ec e Ec/Bd400. Esse mesmo padrão pode-se ser verificado por meio do gráfico de *Cluster* HCA – análise de atributos. O gráfico abaixo demonstra as tendências temporais organizadas por aproximação de padrão.

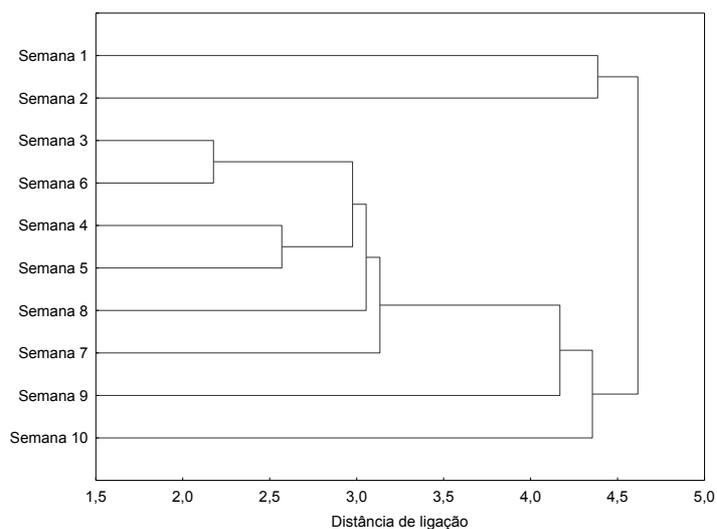
Gráfico 07: Controle de peso semanal – Fenograma de análise de atributos *Cluster* - HCA.



Os dados são apresentados na análise de atributos do fenograma de *Cluster*, demonstram um padrão semelhante no comportamento alimentar das primeiras duas semanas. Posteriormente há uma mudança no padrão alimentar nas: 3<sup>a</sup>, 4<sup>a</sup>, 5<sup>a</sup>, 6<sup>a</sup>, 7<sup>a</sup> e 8<sup>a</sup> semanas, que formam um segundo padrão de comportamento alimentar. Os dados demonstram ainda um terceiro padrão de comportamento alimentar ocorrido na 9<sup>a</sup> e 10<sup>a</sup> semana do experimento. Quanto maior a semelhança entre as semanas, menor a distância de ligação.

Os resultados evidenciam também uma mudança no padrão de controle de peso semanal e no índice de Lee semanal, como pode-se observar no fenograma abaixo.

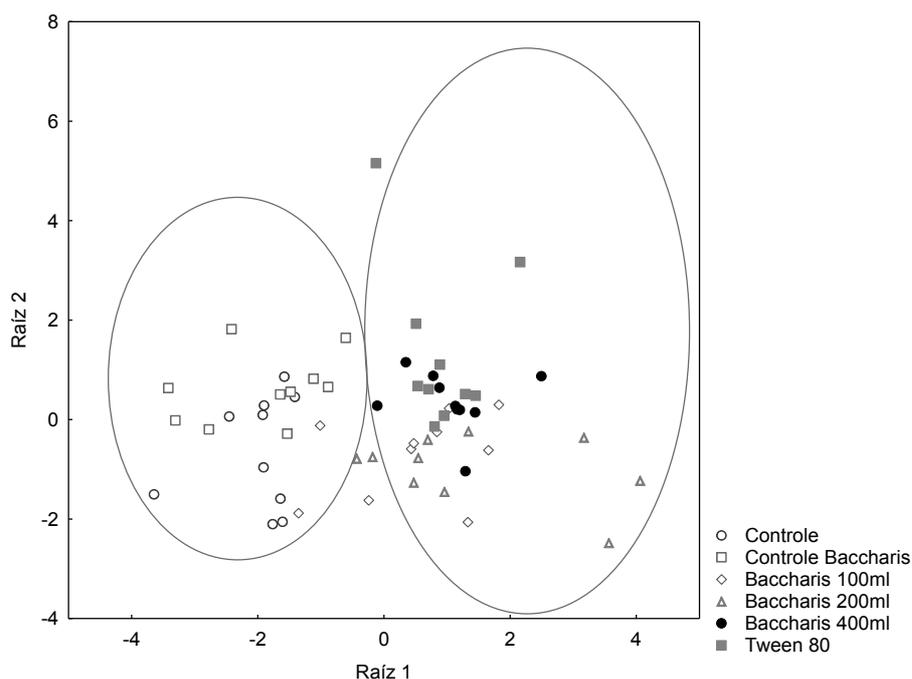
Gráfico 08: Controle de peso semanal – análise de *Cluster* - HCA por análise de atributos.



Os dados são apresentados na análise de atributos do fenograma de *Cluster*, demonstram um padrão semelhante no controle de peso semanal, nas primeiras duas semanas houve semelhança no padrão de peso corporal pelo índice de Lee. Posteriormente ocorreu uma mudança no padrão de peso significativa nas: 3ª, 4ª, 5ª, 6ª, 7ª e 8ª semanas, que formam um segundo padrão referente ao peso. Os dados demonstram ainda uma terceira alteração no padrão de peso corporal nas 9ª e 10ª semana do experimento. Quanto maior a semelhança entre as semanas, menor a distância de ligação.

Outro resultado interessante refere-se a análise discriminante entre grupos que como apresentado a seguir demonstra uma diferença entre o peso semanal dos grupos Controle (Ct) e Controle *Baccharis dracunculifolia* (CBD) em relação aos demais grupos. Pode-se observar que dois grupos citados mantiveram o mesmo peso, enquanto os grupos submetidos ao estresse oscilaram o peso semanal.

Gráfico 09: Análise de discriminante peso semanal.



Os dados são apresentados na análise discriminante de peso semanal demonstra dois padrões distintos de peso. O primeiro grupo representa o peso do grupo Controle e Controle *Baccharis dracunculifolia*, enquanto o segundo grupo representa os demais grupos que por serem submetidos ao estresse crônico variado, modificaram seu peso semanalmente.

A pressão arterial sistólica e média tiveram diferença significativa para o grupo Cs comparado com os demais grupos, com percentual médio de 15% ( $p < 0.05$ ). Em relação à frequência cardíaca, ocorreu diferença para o grupo Cs/b400, comparado com os grupos controles sem estresse, ambos com percentual de 20% ( $p < 0.05$ ).

Gráfico 10: Análise da pressão arterial discriminante peso semanal.

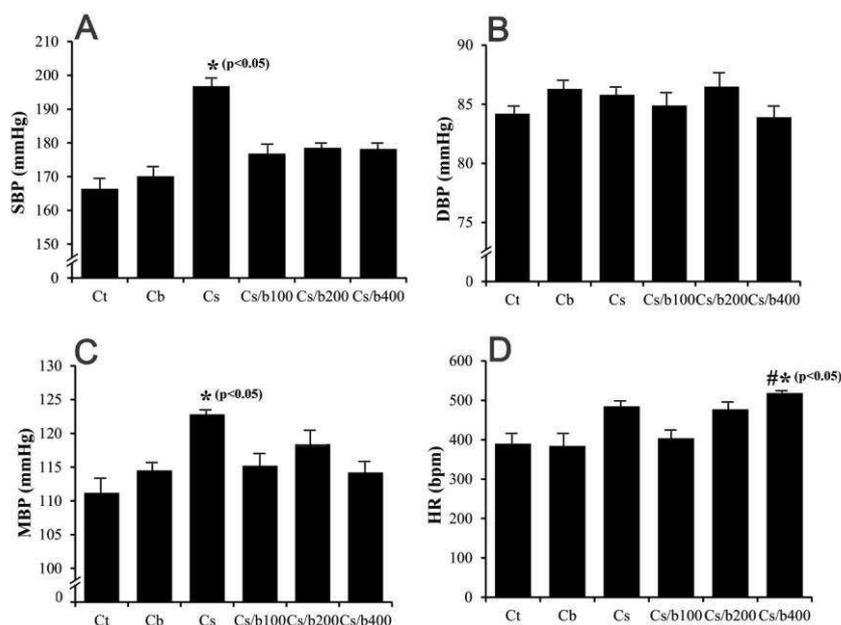


Figura 1: Respostas cardiovasculares antes estresse crônico variável, A: A pressão arterial sistólica; B: A pressão arterial diastólica; C: A pressão arterial média; D: A frequência cardíaca. \* Diferença entre todos os grupos ( $p < 0,05$ , Student- Newman -Keuls após one-way ANOVA). # Diferença entre os grupos CT e Cb ( $p < 0,05$ , Student- Newman -Keuls após one-way ANOVA).

### 4.3 PARÂMETROS BIOQUÍMICOS

Foram analisados os parâmetros bioquímicos referentes a colesterol (COL), Triglicerídeos (TRI), Glicose (GLI) e Corticosterona (CORT). Os resultados indicam alteração entre grupos nos níveis de corticosterona, colesterol e glicose, o grupo de estresse crônico (Ec) apresentou nível significativamente mais baixo em relação aos demais grupos nos níveis acima mencionados com diferença estatística  $p < 0,01$ .

Tabela 07: Parâmetros bioquímicos – colesterol (COL), triglicerídeos (TRI), glicose (GLI) e corticosterona (CORT).

GLICEMIA	Ct	Cbc	Ec	Ec/Bd100	Ec/Bd200	Ec/Bd400
<b>Antes</b>	65,20±10,8	66,00±12,8	80,70±12,6 <sup>a</sup>	66,90±10,8	72,40±12,3	69,60±17,6
<b>Depois</b>	62,60±10,9	72,70±15,7	68,40±17,1 <sup>b</sup>	66,90±12,9	76,00±20,4	73,40±13,3

Os dados são apresentados em médias e  $\pm$  e.p.m. Na tabela acima os dados indicam as diferenças estatísticas de  $p < 0,01$ , usando ANOVA associada a *post hoc* de SNK. Foi utilizada a letra a referenciar o grupo com maior nível mensurado, ab para os grupos intermediários e b para o grupo com menor nível do parâmetro bioquímico mensurado.

Durante o experimento também foi realizado testes glicêmicos. O primeiro foi mensurando num período anterior as atividades de estresse crônico e o segundo após os 40 dias de estresse. A tabela abaixo demonstra que não houve diferença significativa entre as medidas dos níveis de glicemia quando comparado os grupos antes e depois de serem submetidos ao estresse crônico variado. O estresse parece modificar os níveis glicêmicos, análise intra-grupos demonstrou diminuição dos níveis glicêmicos do início das atividades estressoras para o final das atividades estressoras em 15,24% no grupo Ec.

Tabela 08: Parâmetros bioquímicos – níveis glicêmicos.

	Ct	Cbc	Ec	Ec/Bd100	Ec/Bd200	Ec/Bd400
<b>COL</b>	89,1±9,8 <sup>b</sup>	85,3±8,6 <sup>b</sup>	89,0±10,5 <sup>a</sup>	92,6±11,2 <sup>b</sup>	90,3±7,45 <sup>b</sup>	99,7±6,8 <sup>ab</sup>
<b>TRI</b>	79,40±23,8	65,67±17,5	69,67±9,6	74,60±17,0	69,62±14,8	77,30±18,5
<b>GLI</b>	200,10±33,3 <sup>ab</sup>	198,55±38,7 <sup>ab</sup>	184,33±29,3 <sup>a</sup>	194,20±35,5 <sup>ab</sup>	231,10±29,5 <sup>b</sup>	207,60±43,1 <sup>ab</sup>
<b>COR</b>	0,82±0,16	0,94±0,26	0,95±0,25	0,82±0,29	0,80±0,22	0,75±0,17

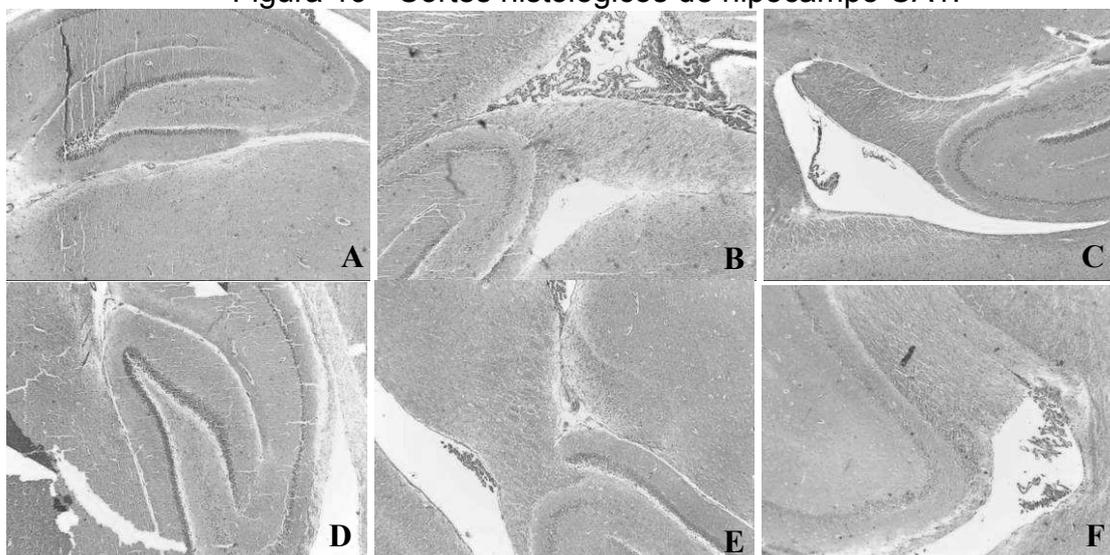
Os dados são apresentados em médias e  $\pm$  e.p.m. Na tabela acima indica que não há diferenças estatísticas entre grupos, usando ANOVA associada a *post hoc* de SNK. No entanto, apresenta diferença intra-grupos em Ec de  $p < 0,05$  utilizando o teste T Student para amostras pareadas. Foi utilizada a letra a referenciar o grupo com nível mensurado, ab para os grupos intermediários e b para o grupo com menor nível do parâmetro bioquímico mensurado.

#### 4.4 ANÁLISE HISTOLÓGICA

Foi realizada análise histológica do coração, hipocampo e glândula adrenal esquerda para verificar possíveis presenças de inflamações e edemas.

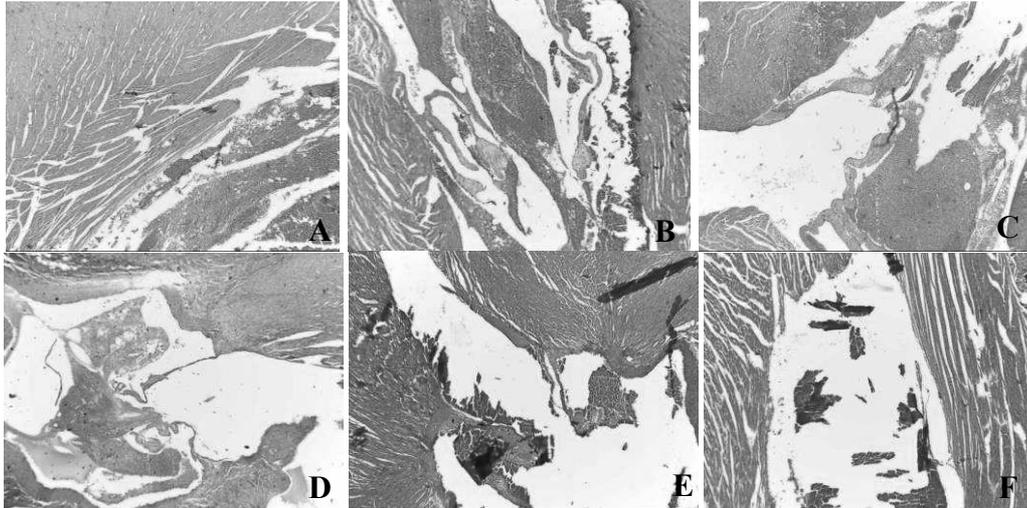
As figuras 16,17, 18 são apresentadas em micrografias de cortes histológicos como anteriormente mencionado do hipocampo, coração e glândula adrenal. Houve um aumento de 400 vezes à microscopia óptica com imagens representativas de um animal de cada grupo. Os resultados demonstraram espessura muscular preservada estruturas valvares sem alteração. Ausência de processo inflamatório ou necrose como pode-se observar nas figuras abaixo

Figura 19 - Cortes histológicos de hipocampo CA1.



Micrografias de hipocampo ao final do experimento. Micrografias de (A) representa o grupo Ct; (B) CBD; (C) Ec/BD 100; (D) Ec/BD 200; (E) Ec/BD 400 e (F) Ec. Microscopia óptica, aumento 400X. Fonte: Dados primários do experimento.

Figura 20 - Cortes histológicos do coração dos grupos.



Micrografias de hipocampo ao final do experimento. Micrografias de (A) representa o grupo Ct; (B) CBD; (C) Ec/BD 100; (D) Ec/BD 200; (E) Ec/BD 400 e (F) Ec. Microscopia óptica, aumento 400X. Fonte: Dados primários do experimento.

Figura 21 - Cortes histológicos da glândula adrenal esquerda dos grupos.

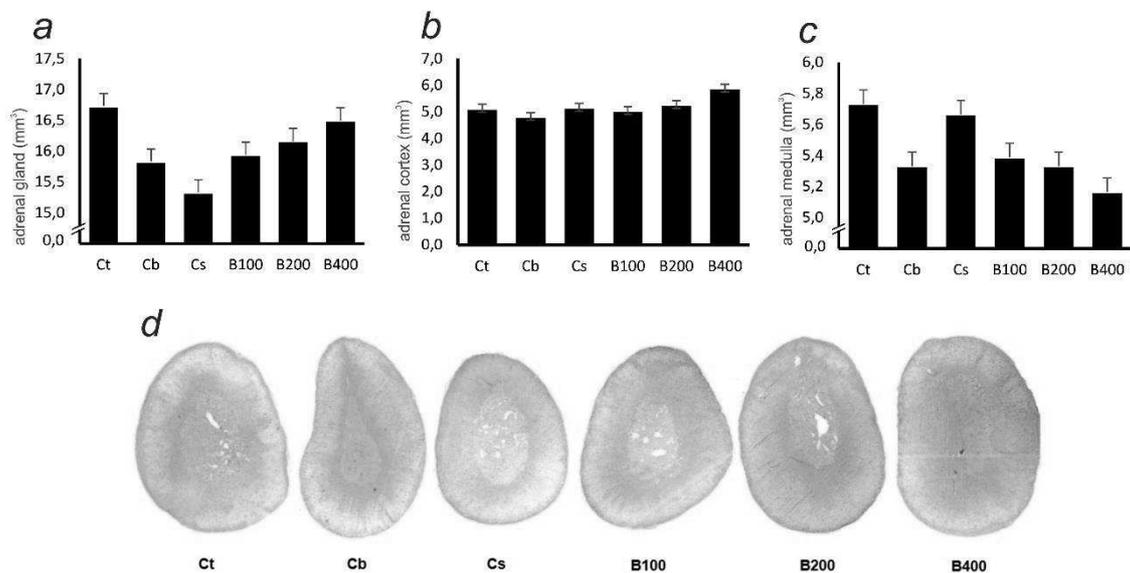


Figura 21. Volumes de córtex supra-renal ( a ) e medula ( b ) de ratos de 11 semanas de idade que transportam o transgene PEPCK - bGH ( L ) , o CMV - IGF1BP - 2 transgene ( B ) , ambos os transgenes ( GB ) , e controles ( não transgênicas C ) . A supra-renal esquerda de todos os animais foi investigada n 3 por grupo. Meios marcado por diferentes expoentes ( a , b , c , d ) são significativamente (  $P < 0,05$  ). c) cortes histológicos representativos das glândulas supra-renais esquerdas de ratos dos diferentes grupos.

## 5. DISCUSSÃO

Os testes comumente utilizados para investigar comportamentos ansiosos e depressivos em ratos são o labirinto em cruz elevado (LCE) e o Open Field (OF). Os resultados evidenciaram que o grupo de estresse crônico permaneceram por tempo mais prolongado nos braços fechados e também maior tentativa de fuga quando comparado com os demais grupos. Esses comportamentos são comuns em animais que apresentam comportamento ansiedade e anedonia, característica importante relacionada à depressão, pois se trata da perda do interesse em realizar atividades, tal resultado corrobora com diversos estudos (AMPUERO *et al* 2015, LEON, CARDENAS, 2013 e RYGULA *et al.*, 2005, MOREAU *et al* 1994). Pode-se perceber que os ratos Ct e CBC permaneceram menos tempo nos braços fechados, seguidos dos grupos Ec/BC200 e Ec/BD400. Os resultados indicam que a *Baccharis dracunculifolia* reverteu o comportamento ansioso e anedônico dos animais. Esse resultado é interessante, pois é o primeiro estudo relacionando a *Baccharis dracunculifolia* no tratamento do estresse crônico variado.

Sobre a tarefa de comportamento alimentar o resultado esperado era de redução do consumo de alimentos doces nos grupos de estresse crônico. A literatura evidencia que os animais quando acometidos pelo estresse crônico diminuem a preferência por alimentos doces devido ao declínio da atividade dopaminérgica cortical e hipocampal hipotalâmica, que reduzem drasticamente as atividades enzimáticas Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>- bem como ATPases nas áreas hipocampais (SANTOS, 2013; GAMARO *et al.*, 2003; RYGULA *et al.*, 2005).

Os resultados da pesquisa, no entanto, demonstraram que do primeiro ao terceiro dia de treinamento da tarefa de comportamento alimentar, os grupos submetidos ao estresse consumiram muito mais alimentos doces do que os grupos controle. Esse resultado parece relacionar-se com a restrição alimentar ao quais os animais foram submetidos. Durante o período de estresse, os grupos submetidos ao estresse crônico variado tiveram como estressor a privação alimentar. Portanto, a experiência pela privação alimentar pode ser considerada um estressor leve. Os estressores leves têm como característica o aumento da expressão de receptores glicocorticóides situados no hipocampo. Há uma preferência por alimentos palatáveis, também conhecidos como *comfort foods*, sem alteração no consumo de ração

(TORRES, 2007 e SILVEIRA, 2004). Os dias seguintes de treinamento à tarefa de comportamento alimentar bem como no dia do teste não houve diferenças significativas entre os grupos, muito provavelmente por habituação ao estressor.

Foi percebido mudanças no padrão alimentar dos animais no decorrer das semanas. Durante a 1ª e a 2ª semana, os animais submetidos ou não ao estresse não apresentaram diferenças no padrão alimentar. No entanto, entre a 3ª e 8ª semana que sucederam o experimento, houve uma mudança tanto no peso bruto dos animais quanto no índice de Lee. Resultado semelhante foi apresentado no gráfico de análise discriminante referente ao peso dos animais. Nesse gráfico fica evidente que o grupo Ct e o CBD apresentaram peso maior do que todos os grupos submetidos ao estresse. O resultado mais expressivo ocorreu na comparação com os grupos Ec e Ec/DB400.

Há diversos fatores envolvidos na perda de peso destes animais. Estímulos aversivos (MARTIN e PEAR, 2013) associado à privação de alimentos (WILNNER, 1997) e a constante gliconeogênese, que como foi anteriormente citada tem como função ampliar a energia corporal para proteção do indivíduo (CARLSON, 2002 e TORRES, 2007).

Por meio das análises bioquímicas apresentadas pode-se verificar que os níveis de corticosterona nos animais Ec e Ec/400 foi significativamente maior tanto dos grupos controle Ct e CBD quanto dos grupos submetidos ao estresse EC/100 e Ec/200. O estudo não contemplou o estudo de ACTH. Porém os níveis plasmáticos de corticosterona no presente estudo corroboraram com a literatura (WANG *et al* 2015, WRIGHT *et al* 2006).

Os resultados demonstraram que a *Baccharis dracunculifolia* nas dosagens de 100 e 200 diminuíram os níveis de corticosterona nos ratos submetidos ao estresse. Os ratos do controle *Baccharis dracunculifolia* também apresentaram níveis mais baixos de corticosterona quando comparado com o grupo controle total. Por se tratar de um estudo pioneiro, não foram encontrados artigos que corroborem com esse resultado, porém existem estudos com estresse que demonstram que algumas plantas auxiliem no processo de redução do cortisol em humanos como a *Magnólis officinalis* e o *Phellodendron amurense* (TALBOTT *et al*, 2013).

Sintetizando, os resultados demonstraram que o modelo de estresse crônico variado induz a manifestação de comportamentos ansiosos e anedônicos, típicos de depressão nos animais. O tratamento com a *Baccharis dracunculifolia* diminui o consumo de *conform foods*.

Atividade de labirinto octagonal tem por objetivo avaliar a memória de trabalho e a memória de referência, também conhecida como memória de longo prazo. Resultados demonstraram não haver alterações nos diferentes grupos em relação à memória de trabalho. Os resultados corroboram com autores que descrevem a memória de trabalho como processo transitório, portanto de difícil de compreensão (CONRAD, 2010). Outros autores relatam dificuldade para associar as funções corticais pré-frontais aos hormônios do estresse, devido à noradrenalina e os glicocorticóides contribuírem no processo atencional e facilitarem o processo de aprendizagem (CARLSON, 2002 e SAPOLSKY, 2004).

Durante os dois primeiros dias de ensaio com os ratos não houve diferença entre os grupos em relação à memória de referência. Esse resultado deve-se provavelmente ao fenômeno de habituação; a característica do protocolo de treinamento no primeiro dia foi de modo automático no aparelho, esse modo gerou estresse tanto do grupo controle quanto e principalmente os grupos submetidos ao estresse; além de aspectos emocionais (CAI, 2010, SANTOS, 2013). No entanto, houve diferença significativa, dos grupos CBD, Ec/BD100 e Ec/BD200. Os grupos citados apresentaram menor quantidade de erros tipo 1 (entrada nos braços sem *Froot Loops*) do terceiro ao sexto dia treinamento, esse erro é classicamente relacionado à memória de referência. Pode-se sugerir que uma facilitação na memória de referência dos animais submetidos à *Baccharis dracunculifolia* nas dosagens de 100, 200 e 400mg.

O estudo apresentou uma facilitação na aprendizagem nos dias de treinamento. Os dias de treinamento são utilizados para aquisição da informação. É importante ressaltar que existem diferenças entre a fase de aquisição e retenção da memória de referência (VASCONCELLOS et al., 2003). O presente estudo evidenciou que a *Baccharis Dracunculifolia* contribui no processo de aquisição, porém não demonstrou diferença na retenção após quinze dias de latência. Esse resultado é importante e corrobora com a análise histológica do hipocampo. Embora os animais fossem estressados, nenhum

dos grupos apresentou alteração como inflamações, edemas ou prejuízo das células hipocâmpais, sendo assim, todos os grupos apresentaram igual desempenho no dia do teste. Esse resultado é diferente do obtido por Tagliari (2011), muito provavelmente esse resultado deve-se ao intervalo entre os estressores e o dia do teste que somaram vinte e cinco dias.

Considerando os resultados dessa pesquisa, pode-se concluir que o protocolo de treinamento utilizado para aquisição da memória, proporcionou facilitação do aprendizado espacial nos animais dos grupos CBD, Ec/BD100 e Ec/BD200. Contudo, questões importantes precisam ser consideradas em relação à utilização da *BD*, como desenvolvimento de novas pesquisas correlacionando à *Baccharis Dracunculifolia* às tarefas de atenção, memória de trabalho e memória de referência.

Outro resultado significativo refere-se a pressão arterial, foi observado aumento significativo da pressão sistólica e média no grupo Ec. A reatividade cardiovascular é considerada o precursor da hipertensão e em humanos está relacionada a comportamentos inassertivos, alexitímicos e estresse emocional (LIPP, FRARE, SANTOS, 2001). A hipertensão é definida como uma síndrome que envolve fatores moleculares, cardíacos, genéticos, vasculares, renais e neurais (MALAGRIS, 2004).

Lipp (2007) mencionou que em 2025 é estimado que 1,56 bilhões de pessoas desenvolvam quadros hipertensos e que em países em desenvolvimento como o Brasil os resultados podem ser mais preocupantes. Malagris e Fioreto (2006) informou que atualmente a hipertensão no Brasil é a doença mais frequente em adultos e também a mais solicitada nos serviços de emergências.

O estresse pode causar diversas disfunções e doenças como asma, alergias, depressão, ansiedade crônica, resistência à insulina, desenvolvimento de úlceras, disfunções imunológicas e alterações cardiovasculares (BRUDER-NASCIMENTO, *et al*, 2013). O resultado da presente pesquisa demonstra o que classicamente é discutido na literatura sobre associação do estresse e transtornos cardiovasculares. As principais alterações suscitadas pelo estresse são: hipertensão arterial, variabilidade na frequência cardíaca, disfunções sistólicas e diastólicas (BRUDER-NASCIMENTO, *et al*, 2013).

Embora não exista consenso sobre os mecanismos envolvidos entre a hipertensão e o estresse, evidências demonstram o aumento de peso da adrenal somado à elevando níveis de corticosterona indicam aumento na atividade HHA. O estresse pode induzir a hipertensão devido ao sistema hormonal envolvido na regulação do volume sanguíneo. A esse sistema é dado o nome de renina-angiotensina-aldosterona e também a adrenalina que é uma amina vasoativas. No presente estudo não pode ser verificada a influência do sistema renina-angiotensina-aldosterona, porém pode-se associar com o aumento da adrenalina devido à hipertrofia das glândulas adrenais, esses dados corroboram com outros estudos. (BRUDER-NASCIMENTO, 2013; SANTOS, 2013; MALAGRIS E FIORITO, 2006).

Além disso, outro sistema importante envolvido tanto na hipertensão como no estresse refere-se à atividade da L-arginina e conseqüentemente de Óxido Nítrico (NO) (BRUDER-NASCIMENTO, 2015; SANTOS, 2013; MALAGRIS, 2004). A L-arginina é um aminoácido semi-essencial. Sua produção ocorre no intestino a partir da L-citrulina. É sintetizada prioritariamente pelo rim e pelo fígado e suas reservas são adquiridas de modo endógeno e exógeno. A L-arginina depende fundamentalmente da síntese realizada nos rins e tem fundamental participação na síntese de Óxido Nítrico (NO) (MALAGRIS, 2004). O Oxido Nítrico (NO) representa um importante vasodilatador, para que funcione corretamente necessita da liberação de fatores de relaxamento e contração, o problema é que esses fatores são alterados tanto com o estresse crônico e agudo quanto na hipertensão.

O NO tem a função de facilitador na liberação de neurotransmissores e respostas imunológicas. No entanto, quando submetidos à estresse ocorre uma diminuição dos níveis de L-arginina. Essa diminuição pode estar relacionada a um aumento no volume do plasma vascular ou a redução do lúmen vascular tanto em pesquisa com modelo animal quanto em humanos (MALAGRIS, 2004). Os resultados da pesquisa demonstram que apenas o grupo Ec desenvolveu alteração na pressão arterial, portanto, pode-se sugerir que a *Baccharis dracunculifolia* evitou a hipertrofia cardíaca e alteração de pressão nos grupos submetidos ao estresse nas doses de 100mg, 200mg e 400mg indicando assim um efeito cardioprotetor. Esses resultados podem estar relacionados ao princípios ativos antioxidantes, anti-inflamatório e

hepatoprotetor presentes na *Baccharis dracunculifolia* (GUIMARÃES *et al*, 2012; ISLA *et al* 2009 e BIONDO *et al*, 2011).

Foram evidentes os benefícios do extrato da *Baccharis dracunculifolia* tanto em atividades mnemônicas, em que a planta parece facilitar o processo de aprendizagem, quanto seu efeito cardioprotetor em ratos wistar. No entanto, mais estudos são necessários para compreender melhor os benefícios da *Baccharis dracunculifolia* e dos processos envolvidos no estresse crônico.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

O objetivo geral desse estudo foi verificar os efeitos da administração da *Baccharis dracunculifolia* sobre parâmetros comportamentais, morfológicos e bioquímicos em ratos submetidos a um modelo de estresse crônico variado. De acordo com os resultados e discussão dos dados obtidos, pode-se sugerir que:

- A administração do *extrato tipo tintura da Baccharis dracunculifolia* sobre a atividade locomotora e ansiedade de ratos submetidos a um modelo de estresse crônico variado foi eficaz nas dosagens de 200mg/Kg e 400mg/Kg.
- Sobre os padrões de comportamento alimentar pode-se perceber que os ratos submetidos a um modelo de estresse crônico variado ingeriram maior quantidade de alimentos palatáveis e na literatura são descritos como *comfort foods*.
- No que se refere a memória de trabalho, não houve diferença entre grupos. No entanto, os animais dos grupos de 100mg/kg e 200mg/kg apresentaram maior rapidez para aprendizagem e memória de referência quando comparado aos grupos Ec e 400mg/kg.
- A pressão sistólica dos animais do grupo Ec foi significativamente superior aos demais grupos.
- Os níveis de corticosterona estavam reduzidos nos animais submetidos ao extrato tipo tintura da *Baccharis dracunculifolia* nas dosagens de 100mg/kg e 200mg/kg

Em síntese, pode-se afirmar que a o extrato tipo tintura da *Baccharis dracunculifolia* foi eficaz em diferentes dosagens na análise dos parâmetros acima citados.

## 6. REFERÊNCIAS

ADBALLAH C. G. JACKOWSKI A., SATO J.R., MAO X., KANG G., CHEEMA R., COPLAN J.D., MATHEW S.J., SHUGU D.C. Prefrontal cortical GABA abnormalities are associated with reduced hippocampal volume in major depressive disorder. **European Neuropsychopharmacology: the journal of the European College of neuropsychopharmacology**. S0924-977X maio de 2015.

ALBUQUERQUE U.P e HANAZAKI N. As pesquisas etnodirigidas na descoberta de novos fármacos de interesse medico e farmacêutico: fragilidades e perspectivas. **Revista Brasileira de Farmagnosia**, 2006, vol 16, pp. 678-689.

AMBUERO E., LUARTE A., SATIBANÉZ M., GODOY M.V., TOLEDO J., VELIZ G.D., CAVADA G., RUBIO J., WYNEKEN U. Two Chronic Stress Models Based on Movement Restriction in Rats Respond Selectively to Antidepressant Drugs: Aldolase C As a Potential Biomarker. **International Journal of Neuropsychopharmacology** Apr 2015.

ARAUJO GG, ARAUJO MB, DANGELO RA, MACHADO FB, MOTA CSA, RIBEIRO C, MELLO MAR. Máxima Fase estável de Lactato em ratos obesos de Ambos os gêneros. **Rev Bras Med Esporte** 2009, 15(1): 46-49.

BADDELEY A., SALA, S.D. Dual-Task Performance in Dysexecutive and Nondysexecutive Patients With a Frontal Lesion. **Neuropsychology**, Vol. 11, No. 2, 187-194, 1997.

BADDELEY, A. D. ANDERSON M.C. EYSENCK M.W **Memória**. Artmed: Porto Alegre, 2011.

BAGUL P.K., MIDDELA H., MATAPALLY S., PADIYA R., BASTIA T., MADHUSUDANA K., REDDY R., CHAKRAVARTY S., BANERJEE S. Attenuation of insulin resistance, metabolic syndrome and hepatic oxidative stress by resveratrol in fructose-fed rats. **Pharmacological Research**. Vol 66 (3) 260-268, setembro 2012.

BANERJEE, R. et al. Effect of chronic mild stress on brain derived neurotrophic factor and nerve growth factor in rat hippocampus. **Neuroscience Research Letters**, v. 3, n. 1, p. 29-34, 2012.

BASKOTA, A,H. TEZUKA, Y. KADOTA, S. Recent progress in pharmacological research of própolis. **Phytotherapy Research** v. 15, p 561-571, 2001.

BASKOTA, A,H. Antiproliferative activity oh the Nettherlands própolis and its active principles in câncer cell lines. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 80, p.67-73, 2002.

BEAR, M.F., CONNORS, B.W. e PARADISO, M.A. **Neurociências – Desvendando o Sistema Nervoso**. Porto Alegre 3ª ed, Artmed Editora, 2008.

BIONDO T.M.A TANAE M.M. COLETTA E.D. LIMA-LANDMAN M.T.R. LAPA A.J. SOUCCAR C. Antisecretory actions of *Baccharis Trimeria* (Less.)DC. AQUEOUS EXTRACT and isolated compounds: analysis of underlying mechanisms. **Journal of Ethnopharmacology**, 2011, vol 136, (2) pp 668-373.

BRUDER-NASCIMENTO, T. et al. Efeitos do estresse crônico e da dieta rica em gordura sobre os parâmetros metabólicos e nutricionais em ratos Wistar. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabolismo**, São Paulo , v. 57, n. 8, p. 642-649, nov. 2013.

BUBELLA R.M., BUBELLA D.M., CILLINO S. Type A behavior pattern: is it risk factor open-angle chronic glaucoma? **Journal of Glaucoma** 23 (4) 199-201, abril-maio de 2014.

BÚFALO, M.C.; CANDEIAS, J.M.G.; SFORCIN J.M. In Vitro cytotoxic effect of Brazilian Grenn Propolis on human laryngeal epidermoid carcinoma (HEp-2) cells. **Evidence based complementary and alternative medicine**, v.6, p. 483-487, 2009.

CAI X.H., ZHOU Y.H., ZHANG C.X., HU L.G., FAN X.F., LI C.C., ZHENG G.Q., G Y.S. Chronic intermittent hypoxia exposure induces memory impairment in growing rats. **Acta Neurobiologia e Experimentals** 70:279-287, 2010.

CAMERON H, GOULD E. Adult neurogenesis is regulated by adrenal steroids in the dentate gyrus. **Neuroscience**. 1994;61(2):203-9.

CAMPEAU S., VIAU V., MORILAK D., RADLEY J. Chronic stress and brain plasticity: mechanisms underlying adaptive and maladaptive changes and implications for stress-related CNS disorders. **Neuroscience e Biobehavioral Reviews**. Junho de 2015.

CANNON WB. The emergency function of the adrenal medulla in pain and the major emotions. **Am J Physiol** 33: 356–372, 1914.

CARLSON, N. R. (2002). **Fisiologia do Comportamento**. 7a ed. Barueri: Ed Manole LTDA.

CREMA L., S, M., TAGLIARI, B., 2010. Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity is reduced in amygdale of rats with chronic stress-induced anxiety-like behavior. **Neurochem. Res.** 35, 1787–1795.

CHROUSOS, G. P. Stress and disorders of the stress system. **Nat Rev Endocrinol**, v. 5, n. 7, p. 374-81, Jun. 2009.

CONRAD, C. D. A critical review of chronic stress effects on spatial learning and memory. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 34, n. 5, p. 742-55, Jun. 2010.

DAMÁSIO, A. R., **O Erro de Descartes. Emoção, Razão e Cérebro Humano**, Companhia da Letra, São Paulo, 1996.

DAROKAR MP., PAL A., SINGH V. A polyphenolic flavonoid glabridin: oxidative stress response in multidrug resistant *staphylococcus aureus*. **Free radical biology & medicine** junho de 2015.

DIAS, A.M. A depressão em humanos e outras espécies. **Estudos de pesquisa em psicologia**, 2009, vol 09, n:3, pp 582-595.

DINIZ, P.D.; MARQUES D.A.; BLAY, S.L.; SCHOR, N.; Stressful life events acute kidney injury in intensive and semi-intensive care units. **Jornal Brasileiro de Nefrologia** vol. 34 (1) 50-57 março de 2012.

DINIZ, J. B. et al. Outlining new frontiers for the comprehension of obsessive-compulsive disorder: a review of its relationship with fear and anxiety. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, São Paulo, v. 34, supl. 1, p. 81-91, June 2012.

ELISABETSKY, E.; COSTA-CAMPOS, L. Medicinal plant genetic resources and international cooperation: the Brazilian perspective. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 51, p. 111-120, 1996.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 4 ed. Parte I São Paulo: Atheneu, 1988.

FERREIRA, G. F. S. **Análise da estrutura fatorial do comportamento exploratório de ratos em modelos de ansiedade, depressão e reconhecimento**. 2010. xii, 91 f., il. Tese (Doutorado em Ciências Comportamentais)-Universidade de Brasília, Brasília, 2010

FRANCI CR. Estresse: processos adaptativos e não adaptativos. In: José Antunes Rodrigues. (Org.). **Neuroendocrinologia Básica e Aplicada**. 1a. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005, v. , p. 210-223

FRIEDMAN M. BOOTH-KEWTEY S. Personality, type A behavior, and coronary heart disease: the role of emotional expression. **Journal of personality and social psychology**, oct 53 (4), 783-792, outubro 1987.

GARCÍA-DIAZ DF, PATERNAIN L, MILAGRO FI, GONZALEZ-MUNIEZA P, MARTINEZ JA, CAMPION J. Regulation by chronic-mild stress of glucocorticoids, monocyte chemoattractant protein-1 and adiposity in rats fed on a high-fat diet. **Physiol Behav**. 2011;103:173-80.

GAMARO G.D. MICHALOWSKI MB. CATELLI D.H. XAVIER M.H. DALMAZ C. Effect of repeated restraint stress on memory in different tasks. **Braz Journal Med Biol. Res**, volume 32 (3) 341-347, março de 1999.

GAMARO, G. D. et al. Reduction of hippocampal Na(+), K(+)-ATPase activity in rats subjected to an experimental model of depression. **Neurochem Res** v. 28, n. 9, p. 1339-44, Sep. 2003.

GILBERTSON M.W., SHENTON M E., CISZEWSKI A., KASAI K. LASKO N.B., ORR S.P., PITMAN R.K. Smaller hippocampal volume predicts pathologic vulnerability to psychological trauma. *Nature Neuroscience*. Vol (5), 11: 1242-1247 novembro 2002.

GOTTIEB M. G. MORASSUTTI A.L. CRUZ I.M. Epidemiological transition, oxidative stress and chronic non-communicable diseases. **Scientia Medica**. 2011;21(2):69-80

GOULD E, McEWEN BS. Neuronal birth and death. *Curr Opin Neurobiol*. 1993;3(5):676-82.

GUIMARÃES N.S.S. MELLO J.C. PAIVA J.S. BUENO P.C.P. BERRETTA A.A. TORQUATO R.J. NANTES I.L. RODRIGUES T. *Baccharis dracunculifolia*, the main source of green própolis, exhibits potente antioxidante activity and prevents oxidative mitochondrial damage. **Food and Chemical Toxicology** 2012, vol 50, (3) march-april, pp 1091-1097.

GUYTON, A.C.; HALL, J.E. **Tratado de Fisiologia Médica**. 11ª ed. Rio de Janeiro, Elsevier Ed., 2006.

HELENE, A. F.; XAVIER, G. F. a construção da atenção a partir da memória. **Rev. Bras. Psiquiat**. v. 25, n. 2, 2003.

HUNZIKER, M.H.L. Comportamento de dor: análise funcional e alguns dados experimentais. **Temas em Psicologia**. 2010, vol 18, n.2, pp 327-333.

ISLA M.I. ZAMPINI I.C. ORDÓÑEZ R.M. CUELLO S. JUÁREZ B.C. SAYAGO J.E. MORENO M.N. ALBERTO M.R. VERA N.R. BEDASCARRASBURE E. ALVAREZ A. CIOCCINI F. MALDONADO L.M. **Journal of Medical Food**. December 2009, 12 (6): 1334-1342.

JACOBS BL, PRAAG H, GAGE FH. Adult brain neurogenesis and psychiatry: a novel theory of depression. **Mol Psychiatry**. 2000;5(3):262-9.

KATZ, R. J. ROTH A.R. Tall pinch induced stress arousal facilitates brain stimulation reward. *Physiol. Behav*. 22: 193- 194, 1979.

KIM J. J., DIAMOND D.M., The stressed hippocampus, synaptic plasticity and lost memories. **Nature Neuroscience** vol 3, 453-462, Junho, 2002.

KUMAR, A. Long-term potentiation at CA3-CA1 hippocampal synapses with special emphasis on aging, disease, and stress. **Front Aging Neurosci**, v. 3, p. 1-20, 2011.

LOAYZA, I.; ABUJDER, D.; ARANDA, R.; JAKUPOVIC, J.; COLLIN, G.; DESLAURIERS, H.; JEAN, F.L. Essential oils of *Baccharis salicifolia*, *B. latifolia* and *B. dracunculifolia*. **Phytochemistry**. 38:2. 381-389, 1995

LENT, R. **Cem bilhões de neurônios? Conceitos fundamentais de neurociência**. 2.ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 2010.

LEON L. A., CARDENAS, F. P. 3, 4-methylenedioxymethamphetamine reverses anxiety induced by chronic mild stress. **Avanços em Psicologia Latinoamerica**, vol.31, n.1, pp. 266-278, 2013.

LEZAK, M.D., HOWIESON, D.B., LORING, D.W., **Neuropsychological Assessment**. 4rd. New York: Oxford University Press, 2004.

LIPP, M. E. N. Estresse emocional: a contribuição de extressores internos e externos. **Revista de Psiquiatria. Clínica**. 28 (6):347-349, 2001.

\_\_\_\_\_. **Mecanismos neuropsicofisiológicos do stress: teoria e aplicações clínicas**. São Paulo: Casado Psicólogo, 2005.

\_\_\_\_\_. **O Stress no Brasil: Pesquisas avançadas**. Campinas, São Paulo: Papyrus, 2004.

\_\_\_\_\_. **O Stress ao longo da vida**. Campinas, São Paulo: Papyrus, 2007.

\_\_\_\_\_. Controle do estresse e da hipertensão arterial. **Arquivos Brasileiros de Hipertensão** 14 (2) 89-93, 2007.

\_\_\_\_\_. FRARE, A; SANTOS, F. Efeitos de variáveis psicológicas na reatividade cardiovascular em momentos de stress emocional. **Estudos Psicológicos**. Campinas, v. 24, n. 2, p. 161-167, June 2007.

LOBO H.G.F., FERREIRA N.L. SOUSA R.B. CARVALHO E.R. LOBO L.D. LOBO J.G.F. Experimental modelo f myocardial infarction induced by isoproterenol in rats. **Rev Bras Cir Cardiovasc**; 26(3); 469-476; 2011.

MADSEN T.M, TRESCHOW A, BENGZON J, BOLWING T.G, LINDVALL O, TINGSTROM A. Increased neurogenesis in a model of electroconvulsive therapy. **Biol Psychiatry**. 2000;47(12):1043-9.

MALAGRIS, L. E. N; FIORITO, A.C.C. Avaliação do nível de stress de técnicos da área de saúde. **Estud. psicol. (Campinas)**, Campinas , v. 23, n. 4, p. 391-398, Dec. 2006 .

MALBERG J.E, EISCH A.J, NESTLER E.J, DUMAN R.S. Chronic antidepressant treatment increases neurogenesis in adult rat hippocampus. **J Neurosci**. 2000; 20(24):9104-10.

MALLOY-DINIZ, L. F., SEDO, M., FUENTES D., LEITE, W.B, **Neuropsicologia: Teoria e Prática**, 11, 187-206. São Paulo: Artmed, 2007.

MAGARIÑOS AM, VERDUGO JM. McEWEN BS. Chronic stress alters synaptic terminal structure in hippocampus. **Proc. Natl Acad Sci** 1997; 94:14002-8.

MARTIN, G., PEAR J. **Modificação de comportamento: o que é e como fazer**. São Paulo: Rocca 8ª edição, 2013.

McEWEN, B.S., SAPOLSKY R.M. Stress and Cognitive function. **Neurobiology** (5) 205-216 (1995).

McEWEN, B.S. The neurobiology of stress: from serendipity to clinical relevance. **Brain Res**, v. 886, n. 1-2, p. 172-89, Dec. 2000.

MIDORIKAWA, K.; BANSKOTA, A. H.; TEZUKA, Y.; NAGAOKA, T.; MATSUHIGE, K.; HUERTAS, A. A.; KADOTA, S. Liquid chromatography–mass spectrometry analysis of propolis. **Phytochemical Analysis**, 12(6), 366-373, 2001

MOREAU J.L. BOURSON A., JENCK F., MARTIN J.R., MORTAS P. Curative effects of the atypical antidepressant mianserin in the chronic mild stress-induced anhedonia model of depression. **Journal of psychiatry and neuroscience**. 1994; 19 (1): 51-56.

NORMAN, D. A. e SHALLICE, T. Attention to Action. Willed and automatic control of behavior. Em R. J. Davidson, G. E. Schwartz e D. Shapiro (Orgs.), **Consciousness and self-regulation (vol. 4)**. New York: Plenum Press 1986.

NOVAES M.L.E. **A via L-arginina-óxido nítrico e o controle do stress em pacientes com hipertensão arterial sistêmica**. Tese de Doutorado. Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, 2004.

OLIVEIRA., R.M. O conceito de Executivo Central e suas Origens. *Psicologia: Teoria e Pesquisa*, vol:23, n:04, 2007.

OMS. **Estratégias de la OMS para a medicina tradicional 2002-2005**. Genebra OMS, 2002.

PAULINO, N. Antiinflammatory effects of a bioavailable compound, artepillin C, in Brazilian propolis. **European journal of pharmacology**, v. 587, 296-301, 2008.

PELLOW, S. et al. Validation of open closed arm entries in an elevated plus maze as a measure of anxiety in the rat. **J Neurosci Methods**, v. 14, n. 3, p. 140-67, Aug. 1985.

PINEL J.P.J (2011). **Biopsychology (8th ed)**. Boston, MA: Pearson Education, Inc.

RAMIRO, F. S.; JÚNIOR I.L. SILVA R.C.B. MONTESANO F.T. NARA R.C.O.; DINIZ, E.A.S. ALAMBERT P.A.; PADOVANI R.C. Investigation of stress, alexiety and depression in women with fibromyalgia: a comparative estudy. **Ver Bras. Reumatol**, 2014, vol 54, nº01 pp27-32)

REIS, C.M.F. Atividade anti-inflamatória, antiúlcera gástrica e toxicidade subcrônica do extrato etanólico de própolis. **Braslian Journal of Pharmacognosy**, v.10 p43-52, 2000.

RODRÍGUEZ M.L., **Efeitos da lesão colinérgica específica do núcleo septal medial no comportamento exploratório de ratos no labirinto em cruz elevado em um paradigma teste-reteste**. Dissertação (mestrado) - Universidade de São Paulo, Programa de Pós-Graduação em Psicobiologia, Ribeirão Preto, 1999.

ROSSET, S. M.. **Terapia Relacional Sistêmica**. 2ª Edição. Curitiba: Artesã, 2013.

RUIZ J.E.; NETO L.B.; SCHOEDL A. F.; MELLO M. F.; Psychoneuroendocrinology of posttraumatic stress disorder. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, 2007, vol 29 (1) pp 7-12.

RYGULA, R. et al. Anhedonia and motivational deficits in rats: impact of chronic social stress. **Behavior Brain Revist.** 162, n. 1, p. 127-34, Jul. 2005.

SANTOS, F. H., "Funções Executivas". In Andrade, V. M., Santos, F.H., Bueno, O.F.A. (2004). **Neuropsicologia Hoje**, 7.125-134. São Paulo: Artes Médicas.

SANTOS F.S., **Efeitos da administração de L-arginina e creatina sobre parâmetros comportamentais de ratos submetidos a um modelo de estresse crônico variado**. Data: 26 de fevereiro de 2013. xvi, 128 f. : il. ; 28 cm. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual do Centro-Oeste, Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva, em associação ampla com a Universidade Estadual de Ponta Grossa, 2013.

SAPOLSKY R.M. Glucocorticoids, stress, and their adverse neurological effects: relevance to aging. **Exp. Gerontol.** 34: 721-732 (1999).

SAPOLSKY R.M. The possibility of neurotoxicity in the hippocampus in major depression: a primer on neuron death. **Biol Psychiatry** 48: 755-765 (2000).

SAPOLSKY, R. M. **Why the zebras don't get ulcers**. 3. ed. New York: Holt Paperbacks, 2004.

SCHACTER DL. Understanding implicit memory: a cognitive neuroscience approach. **Am Psychol** (47) 559-569, 1992.

SCHUTSKY K, OUYANG M, CASTELINO CB, ZHANG L, THOMAS SA. Stress and Glucocorticoids Impair Memory Retrieval via  $\beta_2$ -adrenergic,  $G_{i/o}$ -coupled Suppression of cAMP Signaling. **The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience**. 2011;31(40):14172-14181. doi:10.1523/JNEUROSCI.2122-11.2011.

SELYE, H. A Syndrome produced by diverse nocuous agents. **Nature**. 1936; 138: 32.

SFORCIN J.M. **Baccharis dracunculifolia**, uma das principais fontes de vegetais e própolis brasileira. São Paulo: Editora Unesp, 2012.

SILVA FILHO, A.A. In vitro trypanocidal activity evaluation of crude extract and isolated compounds from baccharis dracunculifolia D.C. (Asteraceae). **Journal of pharmacy and pharmacology** v.56, p1195-1199, 2004.

\_\_\_\_\_. Antimicrobial activity of the extract and isolated compounds xtract and isolated compounds from Baccharis dracunculifolia D.C. (Asteraceae). **Journal of pharmacy and pharmacology** v.63, p40-46, 2008.

\_\_\_\_\_. In vitro antileishmaniaç, antiplasmodial and cytotoxic activities of phenolic and triterpenoids from baccharis dracunculifolia D.C. (Asteraceae). **Fitoterapia** v.80, p478- 482, 2010.

\_\_\_\_\_. A.A. SFORCIN J.M TONUCCI L.R.S.; BÚFALO M.C.; Atividades biológicas da Baccharis Dracunculifolia. In SFORCIN J.M **Baccharis dracunculifolia**, uma das principais fontes de vegetais e própolis brasileira. São Paulo: Editora Unesp, 2012 2004.

SILVEIRA P.P. **Efeitos do estresse neonatal sobre o comportamento alimentar na vida adulta em ratos**. Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Instituto de Ciências Básicas da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Neurociências. Porto Alegre, 2004.

SIMÕES C.M.O.; SCHENKEL, E.P; A pesquisa e a produção brasileira de medicamentos a partir de plantas medicinais: a necessária interação da indústria com a academia. **Revista brasileira de Farmacognosia**, V12, n1, p35-40, 2002.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GUSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTEZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre: Editorada UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 2010.

SPREEN O., STRAUSS E.A., SHERMAN: **Compendium of Neuropsychological test**. 2 nd ed. Oxford, UK: Oxford Univarsity Press, 2006.

TAGLIARI, B. et al. Antioxidants prevent memory deficits provoked by chronic variable stress in rats. **Neurochem Res**, v. 36, n. 12, p. 2373-80, Dec. 2011.

TALBOTT S.M., TALBOTT J.A., OUGH M. Effect of *Magnólia officinalis* and *Phellodendron amaurese* (Relora) on cortisol and psyxhological modd state in moderately stressed subjects. **Journal of international society of Sport Nutrition** 2013, 10-37

TIMO-LARIA (1999). "Sistemas neurovegetativos". In. Aires M. M. (Margarida de Melo) (org), **Fisiologia**. Rio de Janeiro, Editora Guanabara Kogan S.A. 1999. Verificar estilo citação.

TORRES, S. J.; NOWSON, C. A. Relationship between stress, eating behavior, and obesity. **Nutrition**, v. 23, n. 11-12, p. 887-94, Nov./Dec. 2007.

VASCONCELLOS, A. P. S. et al. Effect of chronic stress on spatial memory in rats is attenuated by lithium treatment. **Physiol Behav**, v. 79, n. 2, p. 143-9, Jul. 2003.

VASCONCELLOS, A. P. S. de. et al. Na(+), K(+)-ATPase activity is reduced in hippocampus of rats submitted to an experimental model of depression: Effect of chronic lithium treatment and possible involvement in learning deficits. **Neurobiol Learn Mem**, v. 84, n. 2, p. 102-10, Sep. 2005.

VERDI L.G.; BRIGHENTE, I.M.C; PIZZOLATTI, M.C. Gênero Baccharis (Astraceae): aspectos químicos, econômicos e biológicos. **Química Nova** [s.1] v. 28, n.1, p.85-94, 2005.

WALLEN, W. J.; CSERTI, C.; BELANGER, M. P.; WITTNICH, C. Gender Differences in Myocardial Adaptation to Afterload in Normotensive and Hypertensive Rats. *Hypertension*. v. 36, P.774-779, 2000.

WALSH K.: **Neuropsychology – A Clinical Approach**. 2rd. Edinburgh London Melbourne and New York (1987).

WANG Z-Z, YAHG W-X, ZHANG Y., ZHAO, N., ZHANG Y-Z., LIU Y-Q., LI Y-F., Phosphodiesterase-4D Knock-down in the prefrontal cortex alleviates Chronic Unpredictable Stress-Induced Depressive-Like Behaviors and memory deficits in mice. **Scientific Reports**, 5 11332, 2015.

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

WILSON, B. A.; **Reabilitação da Memória**: Integrando teoria e prática: Artmed, Porto Alegre: 2011

WRIGHT, R.L., LIGHTNER, E.N., HARMAN, J.S., MEIJER, O.C., CONRAD, C. D. Attenuating corticosterone levels on the day of memory assessment prevents chronic stress-induced impairments in spatial memory. **The European Journal of Neuroscience**, 24 (2), 595-605, 2006.

YAU I.H., POTENZA M.N., Stress and eating behavior. **Minerva Endocrinological** 38 (3) 255-267, setembro de 2013.