

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

EFEITO PROTETOR DA FRAÇÃO DE DICLOROMETANO DE *Pfaffia*
glomerata (SPRENG) Pedersen SOBRE PARÂMETROS DE ESTRESSE,
ANSIEDADE E DEPRESSÃO EM CAMUNDONGOS

LETICIA DE ALMEIDA TAKATA

“Monografia apresentada à Coordenação do Curso de Biotecnologia, da Universidade Federal de Uberlândia, para obtenção do grau de Bacharel em Biotecnologia.”

UBERLÂNDIA - MG

JULHO - 2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

EFEITO PROTETOR DA FRAÇÃO DE DICLOROMETANO DE *Pfaffia*
glomerata (SPRENG) Pedersen SOBRE PARÂMETROS DE ESTRESSE,
ANSIEDADE E DEPRESSÃO EM CAMUNDONGOS

LETICIA DE ALMEIDA TAKATA

PROFa. DRa. CÁSSIA REGINA SILVA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

Homologado pela coordenação do Curso
de Biotecnologia em __/__/__

Prof. Dr. Edgar Silveira Campos

UBERLÂNDIA - MG

JULHO – 2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

EFEITO PROTETOR DA FRAÇÃO DE DICLOROMETANO DE *Pfaffia glomerata* (SPRENG) Pedersen SOBRE PARÂMETROS DE ESTRESSE, ANSIEDADE E DEPRESSÃO EM CAMUNDONGOS

LETICIA DE ALMEIDA TAKATA

Aprovado pela Banca Examinadora em: 05/07/ 2018 Nota: _____

Uberlândia, 5 de Julho de 2018

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, a minha irmã e ao meu namorado, por sempre me incentivarem, apoiarem e compreenderem. Obrigada, amo muito vocês.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Adilson e Eliane, por todo apoio e incentivo durante toda a minha vida.

À minha irmã, Juliana, por sempre me apoiar em todas as minhas decisões.

Ao meu namorado, Cláudio Eduardo, por todo suporte, compreensão e carinho antes e principalmente durante a graduação.

À minha orientadora Dr^a. Cássia Regina Silva pela dedicação e paciência acerca de todo o projeto.

Aos colegas do laboratório, Thiago Neves, Pedro Henrique, Kássio Coelho e Karen Ramos e especialmente ao Rodrigo Franco, por me ensinarem e auxiliarem nos experimentos e desenvolvimento do trabalho.

RESUMO

O estresse é um problema atual que afeta tanto a qualidade de vida, quanto a economia de um país, além de estar relacionado a outros transtornos como a ansiedade e a depressão. Os produtos naturais são muito utilizados para o tratamento destas condições, devido basicamente ao baixo custo e fácil acessibilidade. No Brasil os ginsengs são muito utilizados pela população em geral para o tratamento de determinados transtornos psicológicos, principalmente em chás, devido ao seu efeito adaptógeno, ou seja, capacidade de promover aumento da resistência do organismo às influências externas e internas. Há estudos que sugerem que o composto 20-hidróxi-ecdisona é um fitoesteróide responsável por esse efeito adaptógeno e o mesmo está presente na planta ginseng *Pfaffia glomerata* (Spreng) *Pedersen*. Assim, o objetivo desse trabalho foi avaliar a ocorrência de efeitos protetores do tratamento oral com a fração diclorometano da *Pfaffia glomerata* (Spreng) *Pedersen* sobre comportamentos do tipo depressivos e de ansiedade em animais submetidos a um modelo de estresse agudo.

Para tanto, os animais foram separados em 3 grupos, sendo um naive e dois expostos ao modelo de estresse agudo induzido por isolamento social. Dentro dos animais expostos ao estresse agudo, um grupo foi tratado diariamente, uma vez ao dia, com a fração diclorometano da *Pfaffia glomerata* (Spreng) *Pedersen*, nas doses de 1, 3, 10 e 30 mg/kg, por via oral (gavagem), e o outro grupo não foi tratado. Foram realizados os experimentos de campo aberto, labirinto em cruz elevado, nado forçado e teste de preferência a sacarose, reconhecimento de objeto e rotarod, que avaliam coordenação motora, ansiedade, depressão, memória, e sedação, respectivamente, em todos os grupos.

Foi observado que o grupo estressado não tratado desenvolveu alterações na atividade locomotora, onde se observou aumento significativo do número de “crossing” e “rearing”, sugestivo de agitação, relacionado ao estresse, também aumentou o tempo de permanência na periferia, diminuiu o tempo desprendido no centro, e aumentou o número de fezes, sugestivo de ansiedade. Ambas as alterações foram prevenidas pelo tratamento com a fração diclorometano da *Pfaffia glomerata* (3, 10 e 30 mg/kg).

No experimento do labirinto em cruz elevado, o grupo estresse não tratado apresentou maior tempo desprendido no braço fechado em comparação ao braço aberto, sugestivo de ansiedade, e, aumento no tempo de imobilidade durante o nado forçado, sugestivo de comportamento do tipo depressivo. O tratamento com a fração

diclorometano da *Pfaffia glomerata* (30 mg/kg) preveniu o desenvolvimento destes parâmetros. Não foram evidenciadas diferenças significativas nos testes de preferência a sacarose e reconhecimento de objeto no grupo estressado não tratado em relação aos animais naive.

Portanto, o tratamento utilizando a fração de diclorometano da *Pfaffia glomerata* é capaz de prevenir o estresse, a ansiedade e a depressão em animais submetidos ao modelo de estresse agudo. Assim como o mesmo possui grande potencial como adaptógeno e mais estudos deverão ser realizados para confirmar a segurança e eficácia deste tratamento.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
1.1 Estresse	12
1.2 Ansiedade	14
1.3 Comorbidade	14
1.4 Depressão	15
1.5 Produtos naturais.....	16
1.6 Gênero <i>Pfaffia</i>	17
1.7 <i>Pfaffia glomerata</i> (Spreng) <i>Pedersen</i>	18
2. JUSTIFICATIVA	19
3. OBJETIVOS	19
3.1 Objetivo geral	19
3.2 Objetivos específicos.....	19
3.2.1 Avaliar a ocorrência de efeito protetor do tratamento oral com a fração diclorometano da <i>Pfaffia glomerata</i> (Spreng) <i>Pedersen</i> sobre a função motora em animais expostos a situação de estresse agudo	19
3.2.2 Avaliar a ocorrência de efeito protetor do tratamento oral com a fração diclorometano da <i>Pfaffia glomerata</i> (Spreng) <i>Pedersen</i> sobre comportamentos do tipo ansiosos em animais expostos a situação de estresse agudo	20
3.2.3 Avaliar a ocorrência de efeito protetor do tratamento oral com a fração diclorometano da <i>Pfaffia glomerata</i> (Spreng) <i>Pedersen</i> sobre comportamentos do tipo depressivos em animais expostos a situação de estresse agudo	20
3.2.4 Avaliar a ocorrência de efeito protetor do tratamento oral com a fração diclorometano da <i>Pfaffia glomerata</i> (Spreng) <i>Pedersen</i> sobre a memória em animais expostos a situação de estresse agudo	20
3.2.5 Verificar se o tratamento oral com a fração diclorometano da <i>Pfaffia glomerata</i> (Spreng) <i>Pedersen</i> causa sedação em animais expostos a situação de estresse agudo... ..	20
4. MEIOS E MÉTODOS	20
4.1 Animais e reagentes.....	20
4.2 Estresse induzido por isolamento social.....	20
4.3 Fração de diclorometano	21
4.4 Tratamento.....	21
4.5 Design experimental	21
4.6 Avaliação da coordenação motora.....	21
4.6.1 Teste de campo aberto	22

4.7	Avaliação do desenvolvimento de ansiedade	22
4.7.1	Teste de labirinto em cruz elevado (LCE).....	22
4.8	Avaliação do desenvolvimento de comportamentos tipo depressivo.....	22
4.8.1	Teste de nado forçado.....	22
4.8.2	Teste de preferência pela Sacarose	22
4.9	Avaliação da memória	23
4.9.1	Teste de reconhecimento de objeto	23
4.10	Avaliação do efeito sedativo	23
4.11	Teste rotarod.....	23
5.	ANÁLISE ESTATÍSTICA	23
6.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.	24
6.1	Resultados.....	24
6.1.1	Alteração da atividade locomotora em camundongos expostos a modelo de estresse agudo..	24
6.1.2	Desenvolvimento de comportamentos do tipo ansiedade em camundongos expostos ao modelo de estresse agudo	25
6.1.3	Desenvolvimento de comportamento do tipo depressivo em camundongos expostos a modelo de estresse agudo	27
6.1.4	Efeito protetor da fração diclorometano da <i>Pfaffia glomerata</i> (Spreng) <i>Pedersen</i> sobre a função motora de camundongos expostos a um modelo de estresse agudo.....	28
6.1.5	Efeito protetor da fração diclorometano da <i>Pfaffia glomerata</i> (Spreng) <i>Pedersen</i> sobre os comportamentos do tipo ansiedade em camundongos expostos a um modelo de estresse agudo	30
6.1.6	Efeito protetor da fração diclorometano da <i>Pfaffia glomerata</i> (Spreng) <i>Pedersen</i> sobre o comportamento depressivo em camundongos expostos a um modelo de estresse agudo.....	33
6.1.7	Efeito protetor do tratamento oral com a fração diclorometano da <i>Pfaffia glomerata</i> (Spreng) <i>Pedersen</i> sobre a memória em animais expostos a situação de estresse agudo	35
6.1.8	Verificação da ocorrência de efeito do tipo sedação do extrato da <i>Pfaffia glomerata</i> sobre a atividade motora do animal	36
7.	DISCUSSÃO	36
8.	CONCLUSÃO.....	40
9.	REFERÊNCIAS	41

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Design experimental.....	20
Figura 2: Número de crossing (A) e número de rearing (B) dos animais submetidos ao isolamento social, sem tratamento, comparados aos animais naive no experimento de campo aberto.....	23
Figura 3: Tempo desprendido na periferia (A) e no centro (B) dos animais submetidos ao isolamento social, sem tratamento, comparados com animais naive no experimento de campo aberto.....	24
Figura 4: Número de fezes realizadas pelos camundongos submetidos ao isolamento social, sem tratamento, comparados com animais naive no experimento de campo aberto.....	25
Figura 5: Tempo desprendido nos braços fechados (A) e abertos (B) dos animais submetidos ao isolamento social, sem tratamento, comparados com animais naive no experimento de labirinto em cruz elevado.....	26
Figura 6: Tempo de imobilidade em animais submetidos ao isolamento social, sem tratamento, comparados com animais naive no experimento de nado forçado.....	27
Figura 7: Número de crossing (A) e rearing (B) dos animais naive, dos animais submetidos ao isolamento social, sem tratamento, e animais tratados com as doses de 1, 3, 10 e 30 mg/kg da fração diclorometano da <i>Pfaffia glomerata</i> (Spreng) <i>Pedersen</i> no experimento de campo aberto.....	28
Figura 8: Tempo desprendido na periferia (A) e tempo desprendido no centro (B) dos animais naive, dos animais submetidos ao isolamento social, sem tratamento, e animais submetidos ao isolamento social, tratados com as doses de 1, 3, 10 e 30 mg/kg da fração diclorometano da <i>Pfaffia glomerata</i> (Spreng) <i>Pedersen</i> no experimento de campo aberto.....	29
Figura 9: Número de fezes realizadas pelos animais naive, dos animais submetidos ao isolamento social, sem tratamento, e animais submetidos ao isolamento social e tratados com as doses de 1mg/kg, 3 mg/kg, 10 mg/kg e 30 mg/kg da fração diclorometano da <i>Pfaffia glomerata</i> (Spreng) <i>Pedersen</i> no experimento de campo aberto.....	30
Figura 10: Tempo desprendido nos braços fechados (A) e aberto (B) dos animais naive, dos animais submetidos ao isolamento social, sem tratamento, e os animais submetidos ao isolamento social e tratados com as doses de 1, 3, 10 e 30 mg/kg da fração	

diclorometano da <i>Pfaffia glomerata</i> (Spreng) <i>Pedersen</i> no experimento de labirinto em cruz elevado.....	31
Figura 11: Tempo de imobilidade dos animais naive, dos animais submetidos ao isolamento social, sem tratamento, e animais submetidos ao isolamento social e tratados com as doses de 1, 3, 10 e 30 mg/kg da fração diclorometano da <i>Pfaffia glomerata</i> (Spreng) <i>Pedersen</i> no experimento de nado forçado.....	32
Figura 12: Porcentagem de água e água com sacarose consumida pelos grupos de camundongos em naive, dos animais submetidos ao isolamento social, sem tratamento, e animais submetidos ao isolamento social e tratados com as doses de 1, 3, 10 e 30 mg/kg da fração diclorometano da <i>Pfaffia glomerata</i> (Spreng) <i>Pedersen</i> no experimento de preferência a sacarose.....	33
Figura 13: Tempo de exploração de dois objetos idênticos (A) e de objetos diferentes (B) dos animais naive, animais submetidos ao isolamento social, sem tratamento, e os animais submetidos ao isolamento social e tratados com a dose de 30 mg/kg da fração diclorometano da <i>Pfaffia glomerata</i> (Spreng) <i>Pedersen</i> no experimento de reconhecimento de objeto.....	34
Figura 14: Tempo de latência do animal que recebeu salina, do animal tratado com a dose de 30 mg/kg do extrato, e os animais que receberam Diazepam 10 mg/kg no experimento rotarod.....	35

1. INTRODUÇÃO

Os seres vivos são capazes de se adaptarem a situações adversas, garantindo sua sobrevivência e a manutenção da espécie. Essas situações ameaçadoras são chamadas de estressores e as alterações geradas no organismo, de resposta ao estresse. À medida que o mundo se industrializava, o estilo de vida da sociedade se transformava, acarretando diversos problemas como o ritmo de trabalho intenso, acesso desigual à saúde, condições de moradia precárias, distribuição desigual da renda, desemprego, altas taxas de violência e criminalidade (GAVIN 2015; LOPES 2003).

Eventos que antes eram isolados passaram a ser frequentes devido aos problemas do mundo moderno, gerando desgastes físicos, psicológicos e emocionais que podem se transformar em problemas de saúde mental como estresse, ansiedade e depressão (LOPES 2003).

1.1 Estresse

O estresse é a reação do organismo a estímulos que provocam excitação emocional, que ao perturbarem a homeostasia, desencadeiam alterações físicas, mentais e hormonais, disparando um processo de adaptação a um evento ou situação (MARGIS et al 2003; FILGUEIRAS et al 1999). Fisiologicamente, o sistema nervoso responde a esses estímulos em três etapas, a primeira com estimulação do eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal (HHA) e o sistema nervoso simpático (SNS), assim, o hipotálamo secreta o hormônio liberador de corticotrofina (CRH), que estimula a hipófise e produzir o Hormônio Adrenocorticotrófico (ACTH), sendo o último, responsável por estimular a produção de cortisol. Enquanto o sistema nervoso simpático produz noradrenalina e adrenalina, que são os hormônios responsáveis pelo estado de alerta, ou fuga, que aceleram os batimentos cardíacos, dilatam as pupilas, aumentam a oxigenação nos tecidos e os níveis de glicose no sangue. Ambas são secretadas por neurônios adrenérgicos no cérebro, pelo sistema nervoso simpático, sempre que haja estímulo do hipotálamo por algum estressor. O cortisol é produzido no córtex da adrenal, é lançado na corrente sanguínea, estimulado pelo ACTH, o mesmo é responsável por ações catabólicas nos tecidos-alvos, que promove a utilização de fontes de energia do corpo para o enfrentamento da situação ameaçadora (BAUER 2002; GAVIN 2015; LOURES et al 2002).

Na segunda etapa do estresse o organismo se adapta, adequando os níveis hormonais de adrenalina, noradrenalina e cortisol, evitando catabolismo, a

imunossupressão e reparando os danos causados pelo período de estresse. Se a condição estressante for exacerbada ou muito longa, acontece o terceiro estágio, que é patológico, em que há um desequilíbrio do eixo HHA, e conseqüentemente uma liberação descoordenada de cortisol (GAVIN 2015). Assim, quando a atividade do eixo HHA permanece aumentada, Hiper cortisolismo, pode estar associados ao transtorno obsessivo-compulsivo, estresse crônico, transtorno do pânico, depressão melancólica, alcoolismo, diabetes mellitus, transtornos metabólicos na gravidez, transtorno de estresse pós-traumático em crianças e hipertireoidismo. Na redução da atividade do eixo HHA, Hipocortisolismo, podem estar associados a, insuficiência da adrenal, síndrome da fadiga crônica, síndrome da tensão pré-menstrual, fibromialgia, artrite reumatoide, depressão atípica/sazonal, depressão no climatério, hipotireoidismo, asma e transtorno de estresse pós-traumático em adultos (CAMELO e ANGERAMI 2004; FARIAS et al 2011; GAVIN 2015; LOURES et al 2002).

A resposta ao estresse depende da interação entre os ambientes, características genéticas e também do desenvolvimento fisiológico, assim, situações estressoras desencadeiam reflexos diferentes em cada indivíduo, podendo acarretar desde reações assintomáticas até transtornos psiquiátricos. Contudo, tanto eventos estressores cotidianos como esperar em filas, perder coisas e uma discussão no trânsito, quanto situações estressoras como um término de relacionamento, causam um grande desconforto psíquico, contribuindo para o desenvolvimento desses transtornos psiquiátricos (GONTIJO e CUSTÓDIO 2017; MARGIS et al 2003;).

O estresse é resultado de um estado de desequilíbrio, sobrecarga e esgotamento pessoal que interfere na vida do indivíduo, e tem conseqüências fisiológicas, psicológicas e comportamentais. As doenças relacionadas ao estresse se instalam quando há uma desordem na resposta ao estresse, seja por regulação excessiva, prolongada ou inadequada, que na maioria das ocasiões causam esgotamento dos recursos biológicos, favorecendo o aparecimento desses transtornos (GAVIN 2015; GONTIJO e CUSTÓDIO 2017). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) o estresse acomete cerca de 90% da população mundial, e vem sendo associado a diversas doenças como câncer, depressão, problemas cardíacos, ansiedade, impotência sexual e diabetes (LOURES et al 2002, BAUER 2002). Entretanto, os efeitos desse transtorno não afetam somente a qualidade de vida do indivíduo, mas também a economia do país, visto que estudos anteriores comprovam que trabalhadores estressados possuem baixo

desempenho no trabalho. Estatísticas comprovam que os indivíduos estressados são suscetíveis a acidentes no local de trabalho e afastamento do emprego (absenteísmo), bem como gerar maiores custos com a saúde quando comparados aos indivíduos saudáveis, trazendo prejuízos às empresas e ao governo (FILGUEIRAS et al 1999; REIS et al 2010; GAVIN 2015).

1.2 Ansiedade

A ansiedade é um dos efeitos do estresse patológico e assim como o mesmo é considerado um fator de risco para o desenvolvimento de transtornos depressivos em geral, que são extremamente comuns na população, visto que uma em cada quatro pessoas possuem algum transtorno de ansiedade (GUTMAN 2010; SADOCK 2016). É considerado um estado de alerta do organismo, que causa um sentimento vago e desagradável de medo, apreensão, tensão, desconforto e inquietação, geralmente acompanhada por taquicardia, insônia, tontura, e leve desconforto estomacal (BRAGA 2010; SADOCK 2016).

A ansiedade pode se manifestar em circunstâncias que denotem algum perigo eminente originado por uma situação ameaçadora específica ou, simplesmente, por alterações em nosso meio ambiente, no âmbito econômico, social e cultural. Entretanto, a resposta pode adquirir contornos patológicos devido à frequência, duração ou intensidade do estímulo em cada indivíduo (ARAÚJO et al. 2007; BRAGA 2010; CASTILLO 2000; GAVIN 2015).

Fisiologicamente o sistema nervoso responde aos estímulos através da ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA) e do Sistema Nervoso Simpático (SNS), que assim como no estresse, há produção de adrenalina, noradrenalina e cortisol, preparando o corpo para situações ameaçadoras (BRAGA 2010; GAVIN 2015).

A ansiedade é uma resposta normal e adaptativa do corpo, sendo não patológica mesmo se a reação seja exacerbada com uma descarga de hormônios mais elevada, se logo após a excitação, retornar ao seu estado de equilíbrio. No entanto, a mesma passa a ser patológica, quando responder exacerbadamente ao estímulo e a fase de excitação perdurar, podendo acarretar a maioria dos problemas relacionados ao estresse patológico, principalmente transtornos de ansiedade, fadiga e depressão (ARAÚJO et al. 2007; CASTILLO 2000; SADOCK 2016).

1.3 Comorbidade

A comorbidade é a coexistência de dois ou mais transtornos mentais em um mesmo indivíduo, geralmente são crônicos, associados com morbidade significativa, e resistentes a tratamento sendo que a presença da mesma afeta tanto na apresentação clínica quanto na sua evolução natural, podendo até exacerbar ou mascarar o outro (SADOCK 2016; ZALESKI, 2006).

Para que se haja comorbidade entre dois transtornos mentais, é necessário que uma das patologias possa ter relação com a outra ou então a presença de fatores de vulnerabilidade comuns às duas patologias. Contudo, somente é possível salientar a presença de comorbidade se as doenças possuírem relação, podendo surgir simultaneamente ou em sucessão (PETRIBU 2001; SILVEIRA e JORGE 1996).

De acordo com Gutman, estresse e a ansiedade são fatores de risco para o desenvolvimento de transtornos depressivos em geral, sendo a depressão, a patologia mais frequente em pacientes com comorbidade destas duas (GUTMAN 2010; TENG, HUMES e DEMETRIO 2005).

1.4 Depressão

A depressão é um transtorno de humor que se caracteriza pelo humor deprimido ou pela perda de interesse ou prazer (CASTILLO 2000). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), a depressão é considerada o 5º maior problema de saúde pública do mundo, com prevalência no sexo femininos sendo 3,2%, contra 1,9% do sexo masculino com depressão no mundo (GAVIN 2015). É frequentemente correlacionada a farmacodependência, e é um dos transtornos mentais, que mais causa morbidade no mundo, segundo a OMS, sendo responsável por 6,2% das mortes na região europeia (CASTILLO 2000, GAVIN 2015).

A síndrome depressiva é companheira frequente de quase todas as patologias clínicas crônicas, e quando está presente acaba levando a piora na evolução da doença, tornando seu curso mais crônico, com pior prognóstico e resposta ao tratamento, pior qualidade de vida e maior taxa de morbidade. Pesquisas demonstram que cerca de 50% de pacientes com Alzheimer, Parkinson e esclerose múltipla possui depressão, além disso, está muito presente em crianças e jovens com fobia social (CASTILLO 2000; GAVIN 2015; TENG, HUMES e DEMETRIO 2005; PETRIBU 2001).

Desse mesmo modo, pacientes que apresentam comorbidade com depressão apresentam piora de diversos fatores relacionados à saúde em pacientes clínicos, como maior risco de desenvolver diabetes tipo 2, aumento do risco de infarto do miocárdio em

6,3 vezes, aumento da mortalidade de pacientes em programa de diálise, diminuição da queda da sobrevivência de pacientes com câncer, além de aumentar o risco de obesidade e hipotireoidismo (TENG, HUMES e DEMETRIO 2005).

A depressão não acarreta impactos negativos somente para a vida da população, mas também afeta na economia do país, segundo a OMS em 2012, esse transtorno gerou um gasto de 15,6 bilhões de euros na Inglaterra, geralmente resultantes da perda de emprego por absenteísmo ou morte prematura (SADOCK 2016).

Contudo, a manifestação da depressão corresponde ao sexo, idade, fatores socioeconômicos, mudanças no âmbito social ou principalmente eventos independentes traumatizantes. Desse modo, há prevalência da patologia no sexo feminino, na área urbana, em idades mais avançadas, em pessoas com menor grau de escolaridade, de classe econômica baixa e que moram sozinhas. Porém as principais causas de depressão são eventos como a separação conjugal, perda de ente querido, perda de emprego e acidente com lesão corporal (LIMA 1999).

Em Portugal, estudos comprovam que há alta comorbidade entre ansiedade, depressão e estresse, principalmente no sexo feminino, justificando que geralmente indivíduos estressados e/ou ansiosos possuem quadros de depressão (SADOCK 2016). Assim como no estresse e na ansiedade, há alteração nos níveis de noradrenalina presentes no organismo, entretanto, no caso da depressão há a deficiência da mesma (OMS 2001; SADOCK 2016).

Diferentes terapias são aplicadas para o tratamento destas condições como o uso de fármacos ansiolíticos e antidepressivos, de terapias não convencionais como acupuntura, prática de yoga, entre outros. Contudo, devido aos efeitos adversos causados pelos fármacos ansiolíticos e antidepressivos, o uso de produtos naturais na forma de fitoterápicos ou ainda de forma empírica pelo consumo de chás e infusões é cada vez mais utilizado pela população em geral.

1.5 Produtos naturais

Os produtos naturais são tradicionalmente utilizados para o tratamento de doenças e continuam sendo considerados importantes fontes de investigação de novos fármacos em potencial (MONTANARI e BOLZANI 2001). Alguns compostos, derivados dos metabólitos secundários, se consagraram como princípios ativos eficazes, substituindo os fármacos sintéticos, que geralmente possuem efeitos adversos. Neste sentido, um grande número de produtos de origem natural mostram-se promissores no

estudo de novas moléculas bioativas eficazes para o tratamento de várias condições patológicas incluindo a ansiedade, estresse e depressão (VIEGAS, BOLZANI e BARREIRO 2006).

O uso de produtos naturais apresenta como vantagens um baixo custo e maior acessibilidade, visto que o Brasil possui um vasto território vegetativo (VIEGAS, BOLZANI e BARREIRO 2006). O ginseng tem tido grande destaque nos últimos anos sendo empregados para o tratamento de doenças psiquiátricas como a ansiedade e depressão, além de apresentar melhora na resistência física em humanos (ATTELE, WU e YUAN 1999, MONTANARI e BOLZANI 2001).

Ginseng é o nome popular de plantas perenes de raízes carnudas, referente ao *Panax ginseng*, planta típica utilizada na medicina tradicional oriental, da família *Araliaceae* (CORADIN, SIMINSKI e REIS, 2011). O *Panax* possui atividade adaptógena e é normalmente utilizado para o tratamento de problemas circulatórios, possui efeito analgésico, antipirético e anticonvulsivante (NABATA, SAITO e TAKAGI 1973, RAMIREZ 2002), mesmo em pequenas doses pode alterar a pressão arterial e em excesso pode causar náuseas, cefaleias, diarreia, tremores, hipertensão e nervosismo, sendo contra indicado para pessoas saudáveis abaixo dos 40 anos, mulheres com irregularidades menstruais, grávidas, pessoas com hipertensão, diabéticos e asmáticos, entre outros (RATES e GOSMANN 2002, VEIGA JUNIOR, PINTO e MACIEL 2005).

No Brasil o denominado ginseng-brasileiro é utilizado em chás e infusões com finalidades semelhantes ao *Panax ginseng*, que apesar de possuírem efeitos terapêuticos (efeito adaptógeno) e características morfológicas semelhantes, são de famílias distintas. O ginseng-brasileiro é o nome popular da *Pfaffia glomerata* (Spreng) Pedersen, contudo há a comercialização e utilização da mesma, acreditando-se ser o *Panax ginseng* (RATES e GOSMANN 2002).

1.6 Gênero *Pfaffia*

A *Pfaffia paniculata*, a *Pfaffia irisinoides* Sprengel e a *Pfaffia glomerata* (Spreng) Pedersen são os principais exemplos de plantas do gênero *Pfaffia*, da família *Amaranthaceae*, que no Brasil abrange 27 espécies, sendo as raízes utilizadas em chás, em pós e recentemente em comprimidos fitoterápicos, para a recuperação de estados debilitantes, ou simplesmente para manter a saúde. (GAVIN 2015; RATES e GOSMANN 2002, VEIGA JUNIOR, PINTO e MACIEL 2005).

Apesar de serem do mesmo gênero, a *Pfaffia paniculata*, *Pfaffia irisinoides Sprengel* e *Pfaffia glomerata (Spreng) Pedersen*, possuem diferenças na composição química, efeitos farmacológicos e toxicológicos (RATES e GOSMANN 2002; TANIGUCHI et al. 1997). *Pfaffia paniculata* é a mais utilizada em fitoterápicos, como afrodisíaco, cicatrizante, para melhorar a memória e a circulação sanguínea, já em ensaios pré-clínicos, seu extrato hidroalcoólico apresentou efeito analgésico, anti-inflamatório, contra esgotamento e fadiga crônicos, e de baixa toxicidade em camundongos. Entretanto, apresentou reação alérgica (asma ocupacional) em trabalhadores que realizavam o processamento da raiz (OLIVEIRA 1986; RATES e GOSMANN 2002).

Pfaffia irisinoides Sprengel é indicada para aumentar força muscular, diminuir anemia, estresse, fadiga e dor de cabeça, e em ensaios recentes apresentou efeito anti-inflamatório, entretanto causou efeito mutagênico em ensaios com *Salmonella typhimurium*, e em altas doses pode causar nervosismo, pressão alta e insônia (RATES e GOSMANN 2002).

1.7 *Pfaffia glomerata (Spreng) Pedersen*

A *Pfaffia glomerata (Spreng) Pedersen*, popularmente conhecida como Ginseng-brasileiro, é empiricamente utilizada em chás para efeitos tônicos, fortificantes, regeneradores, restaurativas, anti-estresse, afrodisíacos, analgésicos, tranquilizantes, cicatrizantes, anti-inflamatórios, e melhora da memória, visão e funções cognitivas. (OLIYNYK e OH 2013; RATES e GOSMANN 2002). Em laboratório, ensaios comprovaram que a mesma apresenta uma atividade depressora do sistema nervoso, e atividade antimicrobiana (RATES e GOSMANN 2002), assim como, estudos *in vivo* com frações da planta demonstraram melhora no aprendizado e memória em ratos idosos, e melhoras em testes cognitivos com ausência de efeitos tóxicos em voluntários idosos (RATES e GOSMANN 2002).

A mesma é objeto de estudo devido ao seu potencial adaptógeno, ou seja, capacidade de promover aumento da resistência do organismo às influências externas e internas, como em infecções e estresse além de apresentar uma baixa incidência de efeitos adversos e baixa toxicidade (CORADIN, SIMINSKI e REIS 2011; GAVIN 2015). O composto 20-hidroxi-ecdisona é um fitoesteróide presente no extrato do ginseng-brasileiro, que auxilia no processo de ecdise em artrópodes, facilita o ganho de

massa em humanos e possui potencial ansiolítico (PELOSO 2007; RATES e GOSMANN 2002).

Os adaptógenos que possuem a capacidade de aumentar o desempenho físico e mental são chamados actoprotetores. Essa subclasse influencia o metabolismo energético diminuindo o glicogênio e fosfocreatina contidos no fígado, a glicose na corrente sanguínea, diminui a acumulação da lactato nos tecidos e no sangue e impede um aumento na produção e consumo de oxigênio (GAVIN 2015; OLIYNYK 2013).

Assim sendo, a hipótese do presente trabalho é de que a fração de diclorometano, fração com maior concentração de 20-hidroxi-ecdisona, obtido da raiz do ginseng-brasileiro tenha efeitos protetores sobre os parâmetros de função motora, ansiedade, depressão, memória, e sedação, em animais submetidos a um modelo de estresse agudo.

2. JUSTIFICATIVA

Devido ao uso popular da *Pfaffia glomerata* (Spreng) *Pedersen* em chás de efeito tranquilizante e principalmente pelo efeito adaptógeno da planta, o estudo busca comprovar os efeitos protetores da mesma sobre os parâmetros de função motora, ansiedade, depressão, memória, e sedação, em camundongos submetidos a um modelo de estresse agudo induzido por isolamento social associado à privação hídrica e calórica.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O objetivo geral do presente projeto é avaliar a ocorrência de efeitos protetores do tratamento oral com a fração diclorometano da *Pfaffia glomerata* (Spreng) *Pedersen* sobre os parâmetros de função motora, ansiedade, depressão, memória, e sedação, em animais submetidos a um modelo de estresse agudo.

3.2 Objetivos específicos

3.2.1 Avaliar a ocorrência de efeito protetor do tratamento oral com a fração diclorometano da *Pfaffia glomerata* (Spreng) *Pedersen* sobre a função motora em animais expostos a situação de estresse agudo;

3.2.2 Avaliar a ocorrência de efeito protetor do tratamento oral com a fração diclorometano da *Pfaffia glomerata* (Spreng) *Pedersen* sobre comportamentos do tipo ansiosos em animais expostos a situação de estresse agudo;

3.2.3 Avaliar a ocorrência de efeito protetor do tratamento oral com a fração diclorometano da *Pfaffia glomerata* (Spreng) *Pedersen* sobre comportamentos do tipo depressivos em animais expostos a situação de estresse agudo;

3.2.4 Avaliar a ocorrência de efeito protetor do tratamento oral com a fração diclorometano da *Pfaffia glomerata* (Spreng) *Pedersen* sobre a memória em animais expostos a situação de estresse agudo;

3.2.5 Verificar se o tratamento oral com a fração diclorometano da *Pfaffia glomerata* (Spreng) *Pedersen* causa sedação em animais expostos a situação de estresse agudo.

4. MEIOS E MÉTODOS

4.1 Animais e reagentes

Foram utilizados camundongos C57BL/6 machos de 6-8 semanas de idade (20g), provenientes do biotério do Centro de Criação de Camundongos da Universidade Federal de Uberlândia, Campus Umuarama, mantidos sob condições de temperatura (23-25 °C) e o ciclo claro/escuro de 12 h, com livre acesso à ração e água. Os experimentos foram conduzidos de acordo com o comitê de ética animal da UFU Umuarama (protocolo 100/16) e ZIMMERMANN, 1983. A maioria dos reagentes utilizados foram adquiridos da Sigma (EUA). Os reagentes que não eram esta procedência foram de qualidade P.A. e de fonte confiável.

4.2 Estresse induzido por isolamento social

O modelo compreende a exposição dos animais a 12 h de isolamento social, overnight, em gaiolas individuais (30 × 20 × 12.5 cm), na ausência de água e comida, e de forma que não tenham contato visual com os demais (TAKATSU-COLEMAN et al., 2013). Após este período os animais foram realocados em grupos e submetidos às análises comportamentais pelo período de 5 dias.

4.3 Fração de diclorometano

Primeiramente foi obtido o extrato bruto, para isso foi utilizado 1 kg da raiz da *Pfaffia glomerata* que foi macerada e imersa em 5,0 L de metanol 99,8% (proporção de 1:5 m.v-1), durante 6 dias, em seguida a solução foi filtrada e o solvente removido em rotaevaporação sob pressão reduzida a 40 °C, e por fim, congelado e liofilizado para a remoção da água. A fração de diclorometano, que possui o composto 20-hidroxi-ecdisona em maior concentração, foi obtida a partir do extrato bruto, que foi solubilizado em 200 mL de solução metanol:água (9:1), em seguida foram realizadas quatro extrações com 200 mL de hexano, diclorometano, acetato de etila e n-butanol e água, respectivamente, para o fracionamento por polaridade. Assim, os solventes das frações foram totalmente removidos por rotaevaporação sob pressão reduzida a 40° C, sendo a fração de interesse, congelada e liofilizada e armazenadas a -20° C. Para o experimento a fração de diclorometano foi pesada e ressuspendida em água de acordo com cada dose.

4.4 Tratamento

Os animais foram tratados diariamente, uma vez ao dia, sempre pela manhã, com a fração diclorometano da *Pfaffia glomerata* (Spreng) *Pedersen*, nas doses de 1, 3, 10 ou 30 mg/kg, por via oral (gavagem), iniciando 3 dias antes da indução do estresse e encerrando no dia 5 após o estresse. Foram utilizados 6 grupos no total, separados em naive, estresse sem tratamento e estresse tratado com as diferentes doses, cada grupo com 5 animais.

4.5 Design experimental

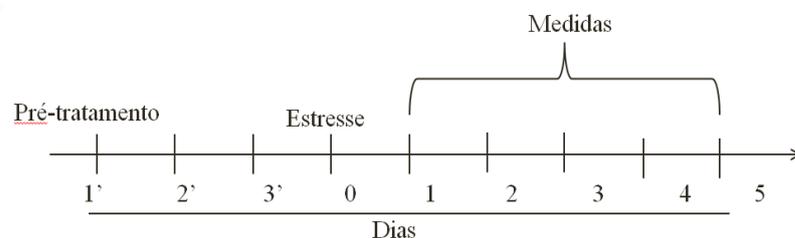


Figura 1: o design experimental consiste em um pré-tratamento durante 3 dias (1', 2' e 3') antes da indução ao estresse, e o tratamento juntamente com as medidas abaixo, durante 5 dias (1, 2, 3, 4 e 5) após a indução do estresse.

4.6 Avaliação da coordenação motora

4.6.1 Teste de campo aberto

Os animais foram colocados no centro de uma arena circular (50 cm de diâmetro) com o assoalho marcado com pequenos quadrados simétricos, o que permite a quantificação da atividade locomotora dos animais. O tempo de observação foi de 5 minutos, sendo o número de crossing (cruzamentos), o número de vezes em que o animal fica apoiado nas patas traseiras (rearing), a defecação do animal e o tempo despendido no centro e na periferia da arena, anotado (CRUZ et al. 2012).

4.7 Avaliação do desenvolvimento de ansiedade

4.7.1 Teste de labirinto em cruz elevado (LCE)

O LCE para camundongos é feito de madeira e constituído por dois braços abertos em sentidos opostos (30 x 5 cm) sem paredes laterais, perpendiculares a dois braços cercados por paredes laterais (30 x 5 x 15 cm), apresentando uma plataforma central comum a todos os braços (5 x 5 cm). A plataforma fica a 50 cm do solo e possui uma borda de madeira (1 cm) nos braços abertos para impedir a queda do animal. Os camundongos foram posicionados no centro da plataforma com a cabeça virada para o braço fechado, podendo explorar livremente o labirinto durante 5 minutos. O tempo de permanência nos braços abertos e fechados foi cronometrado (CAMPOS et al. 2013).

4.8 Avaliação do desenvolvimento de comportamentos tipo depressivo

4.8.1 Teste de nado forçado

Os camundongos foram colocados individualmente em cilindros de vidro (17 cm de diâmetro e 25 cm de altura) contendo água até 10 cm de altura e mantido a 23-25 °C. Os animais foram deixados neste ambiente por 6 minutos, sendo os dois primeiros minutos de ambientação, e nos demais minutos foi registrado (cronometrado) o tempo em que permanecerem imóveis (realizando apenas pequenos movimentos para auxiliar na flutuação). A água foi trocada entre cada grupo (ZANELATTI et al., 2010). Os resultados foram expressos como tempo, em segundos, de imobilidade.

4.8.2 Teste de preferência pela Sacarose

Os animais foram expostos a duas garrafas, uma contendo apenas água autoclavada e a outra contendo água com sacarose 2%, conforme descrito por TAKATSU-COLEMAN et al, 2013. Na primeira exposição as garrafas foram colocadas

em uma posição na caixa por 30 min, para livre alimentação do animal, após esse tempo na segunda exposição, as garrafas foram trocadas de posição e deixadas por mais 30 min (PEREIRA e SÉRIO 2010). Cada animal foi exposto sozinho às duas garrafas, assim, calculou-se consumo de sacarose do mesmo. Não houve privação de água ou comida. Ao final da exposição foi calculado a porcentagem de consumo de sacarose pela equação $VS/VT * 100$, sendo VS o volume de sacarose consumido e VT o volume total, sendo o volume de água mais o volume de sacarose consumido pelo animal. Também foi realizada a pesagem das garrafinhas antes e depois de colocar na gaiola para expressar por variação de peso (PEREIRA e SÉRIO 2010).

4.9 Avaliação da memória

4.9.1 Teste de reconhecimento de objeto

Os animais foram colocados individualmente em uma caixa vazia durante 15 minutos por 3 dias seguidos para a ambientação, sendo que no terceiro dia os mesmos foram individualmente recolocados na caixa na presença de dois objetos idênticos, permanecendo por 7 minutos para a livre exploração dos mesmos. Após esse tempo, retiraram-se os animais e um dos objetos foi substituído por um diferente, após uma hora, o animal foi introduzido novamente na caixa e foi cronometrado o tempo que o mesmo explora cada um dos objetos (GARCIA, ESQUIVEL 2018).

4.10 Avaliação do efeito sedativo

4.10.1 Teste rotarod

Os animais foram colocados em um aparato equipado com uma barra de rotação, que gira em velocidade de 5 giros/min, com 1 cm de diâmetro e 5 cm de comprimento. A habituação de todos os camundongos consiste na exposição dos mesmos ao equipamento e os animais que caíram três vezes ou mais durante 120 minutos foram excluídos do teste. Após 24 horas os camundongos que foram habituados, foram submetidos a administração oral da dose de 1mg/kg, 3 mg/kg, 10 mg/kg e 30 mg/kg, 120 minutos antes do experimento. O animal foi submetido ao experimento durante 2 minutos, sendo o tempo de latência da queda do animal da barra cronometrado manualmente, em segundos.

5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas dos dados foram realizadas pelos métodos de variância multivariada (MANOVA), variância a um critério (one-way ANOVA), e teste de comparações múltiplas de Bonferroni (teste t), de acordo com as variáveis e grupos comparados, sendo que as diferenças serão consideradas significativas para valores de $P < 0,05$. Foi utilizado o programa graph prism versão 5 para confecção dos gráficos e análise dos resultados.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO.

6.1 Resultados

As figuras abaixo representam o resultado dos experimentos de campo aberto, labirinto e nado forçado em 10 camundongos machos, divididos em grupo naive e grupo estresse. Este primeiro bloco de resultados se refere à padronização do modelo.

6.1.1 Alteração da atividade locomotora em camundongos expostos a modelo de estresse agudo:

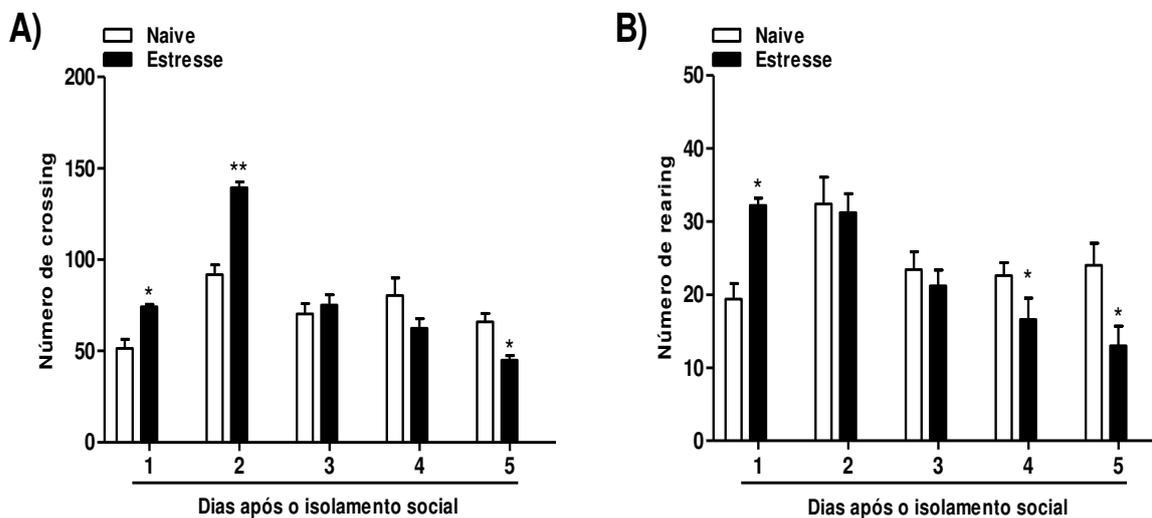


Figura 2: Número de crossing (A) e número de rearing (B) durante os 5 minutos de teste, em animais submetidos ao isolamento social, comparados aos animais naive no experimento de campo aberto. Cada barra vertical representa a média de 5 animais e as barras horizontais mostram os dias após o isolamento social. * $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$ indicam a diferença significativa

do grupo naive em comparação com o grupo estresse no teste t seguido de pós-teste Mann-Whitney.

Na figura 1A é possível observar um aumento na função motora nos dias 1 e 2, causada pela exposição ao modelo de estresse agudo. Já no dia 3 e 4 não houve alteração do comportamento, seguido por uma diminuição do número de crossing no dia 5, sempre comparando com o grupo naive. Na figura 1B é possível observar um aumento significativo na atividade exploratória no primeiro dia, seguido de uma queda no número de rearing, nos dias 4 e 5, comparado ao grupo naive.

6.1.2 Desenvolvimento de comportamentos do tipo ansiedade em camundongos expostos ao modelo de estresse agudo

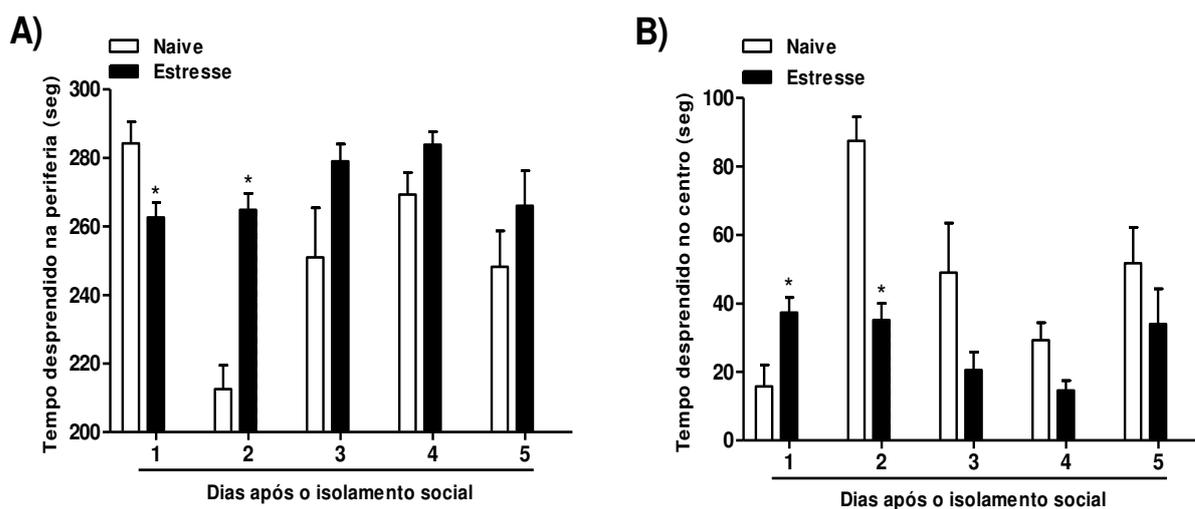


Figura 2: Tempo despendido na periferia (A) e no centro (B) em animais submetidos ao isolamento social comparados com animais naive no experimento de campo aberto. Cada barra vertical representa a média de 5 animais e as barras horizontais mostram os dias após o isolamento social. * $P < 0.05$ indica a diferença significativa do grupo naive em comparação com o grupo estresse no teste t seguido de pós-teste Mann-Whitney.

Na figura 2A é possível observar que houve uma menor permanência dos animais expostos ao modelo de estresse agudo na periferia apenas no primeiro dia, com uma diminuição do mesmo na periferia da caixa a partir do segundo dia, e este aumento se mantém até o último dia de experimento, sempre em comparação ao grupo naive. Da

mesma forma, observa-se que os animais expostos ao estresse agudo permanecem mais tempo no centro no primeiro dia, com uma queda desta permanência nos demais dias, quando comparados aos animais naive.

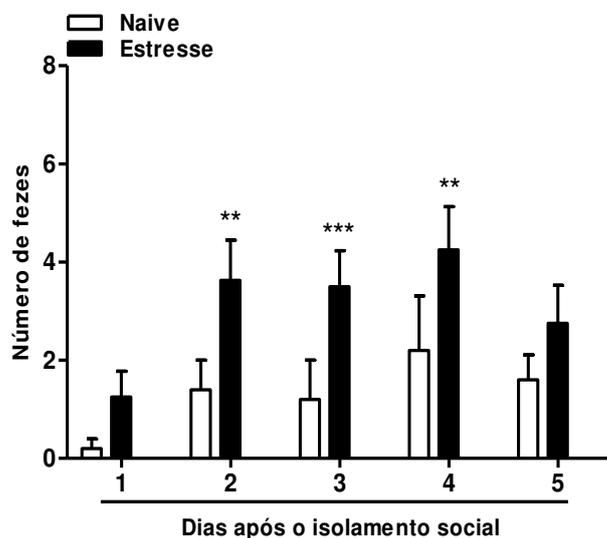


Figura 3: Número de fezes realizadas pelos camundongos submetidos ao isolamento social comparados com animais naive no experimento de campo aberto, durante os cinco minutos de teste. Cada barra vertical representa a média de 5 animais e as barras horizontais mostram os dias após o isolamento social. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$ indicam a diferença significativa do grupo naive em comparação com o grupo estresse no teste t seguido de pós-teste Mann-Whitney.

Na figura 3 é possível observar que há um aumento significativo do número de fezes durante os dias 2 a 4 após o isolamento, entre os animais naive e animais expostos ao modelo de estresse agudo no tempo de imobilidade.

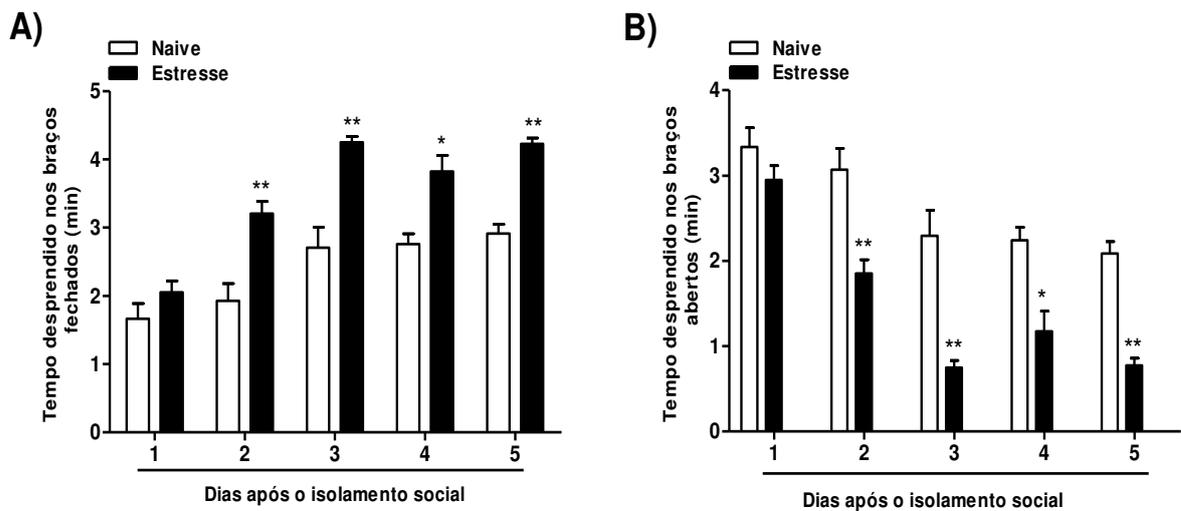


Figura 4: Tempo despendido nos braços fechados (A) e abertos (B) do labirinto em cruz elevado em animais submetidos ao isolamento social comparados com animais naive. Cada barra vertical representa a média de 5 animais e as barras horizontais mostram os dias após o isolamento social. * $P < 0.05$ e ** $P < 0.01$ indicam a diferença significativa em comparação com o grupo naive no Teste t seguido de pós teste Mann-Whitney.

Na figura 4A é possível observar que houve uma maior permanência dos animais expostos ao modelo de estresse agudo nos braços fechados dos dias 2 a 5. Com isso, apresenta menor tempo de permanência nos braços abertos quando observados nos dias 2 a 5 após a exposição ao estresse agudo.

6.1.3 Desenvolvimento de comportamento do tipo depressivo em camundongos expostos a modelo de estresse agudo

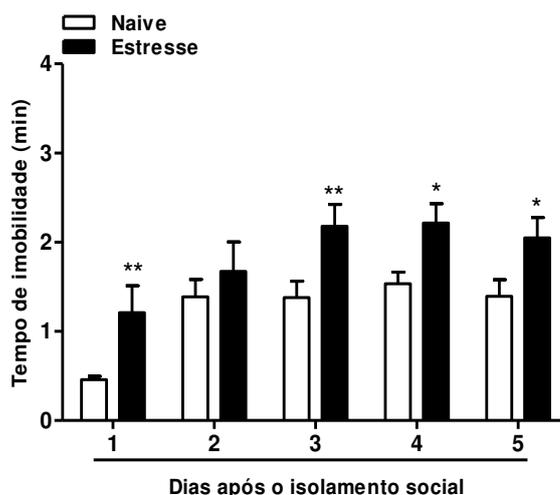


Figura 5: Tempo de imobilidade em animais submetidos ao isolamento social comparados com animais naive no experimento de nado forçado. Cada barra vertical representa a média de 5 animais e as barras horizontais mostram os dias após o isolamento social. * $P < 0.05$ e ** $P < 0.01$ indicam a diferença significativa em comparação com o grupo naive no Teste t seguido de pós-teste Mann-Whitney.

Na figura 5 é possível observar um aumento significativo no tempo de imobilidade durante os dias 1, 3, 4 e 5 após a exposição ao estresse agudo, quando comparados ao grupo naive.

As figuras abaixo demonstram os resultados dos testes de campo aberto, labirinto e nado forçado, analisando parâmetros de estresse, ansiedade, depressão e memória em 25 camundongos machos, divididos em grupo estresse, grupo tratado com as doses de 1, 3, 10 e 30 mg/kg a fração diclorometano da *Pfaffia glomerata* (Spreng) Pedersen, cada grupo com 5 animais.

6.1.4 Efeito protetor da fração diclorometano da *Pfaffia glomerata* (Spreng) Pedersen sobre a função motora de camundongos expostos a um modelo de estresse agudo

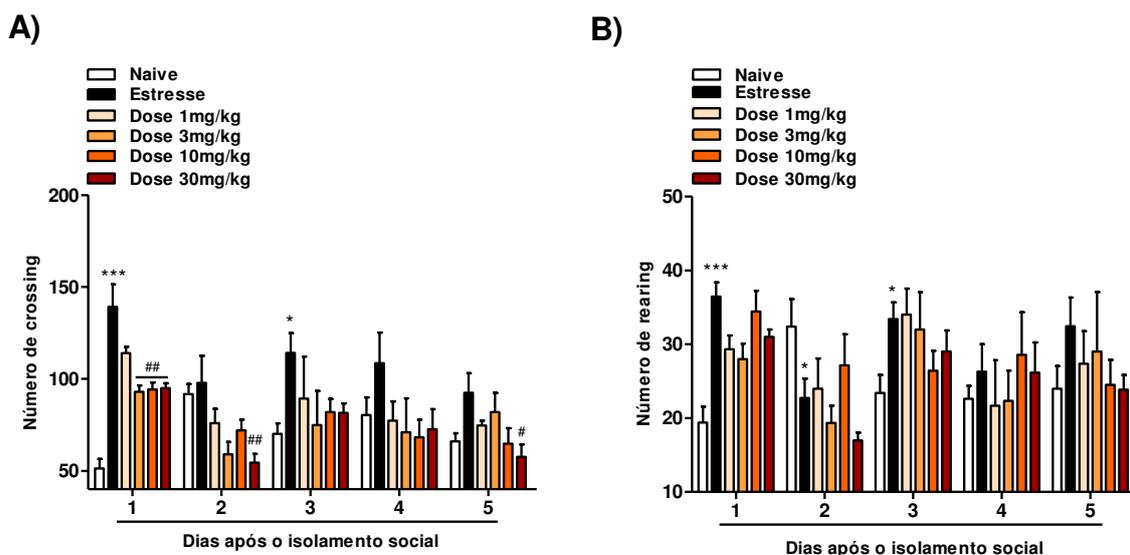


Figura 6: Número de crossing (A) e rearing (B), durante os 5 minutos de teste, em animais sem tratamento, e animais tratados com as doses de 1, 3, 10 e 30 mg/kg da fração diclorometano da *Pfaffia glomerata* (Spreng) *Pedersen* e submetidos ao isolamento social. Cada barra vertical representa a média dos animais e os pontos na horizontal mostram os dias após o isolamento social. * $P < 0.05$ e *** $P < 0.001$, indicam a diferença significativa do grupo naive em comparação com o grupo estresse. # $P < 0.05$ e ## $P < 0.01$ indicam a diferença significativa do grupo estresse em comparação aos grupos tratados com as doses de 1, 3, 10 e 30 mg/kg da fração diclorometano da *Pfaffia glomerata* (Spreng) *Pedersen*. ANOVA de uma via seguida de pós-teste Dunnet.

Na figura 6A é possível observar um aumento na função motora nos dias 1 e 3, causada pela exposição ao modelo de estresse agudo. Ainda, é possível observar que o tratamento com a fração diclorometano da *Pfaffia glomerata* (Spreng) *Pedersen*, nas doses de 3, 10 e 30 mg/kg foram capazes de prevenir este aumento no dia 1, e a dose de 30 mg/kg tem efeito protetor similar no dia 2 e 5 após o estresse. Na figura 6B é possível observar um aumento na atividade exploratória nos dias 1 e 3, e diminuição dessa atividade no dia 2, causado pela exposição ao modelo de estresse agudo. Ainda, é possível observar que nenhuma dose do tratamento com a fração diclorometano da *Pfaffia glomerata* (Spreng) *Pedersen* teve efeito significativo sobre a atividade locomotora no animal.

6.1.5 Efeito protetor da fração diclorometano da *Pfaffia glomerata* (Spreng) *Pedersen* sobre os comportamentos do tipo ansiedade em camundongos expostos a um modelo de estresse agudo

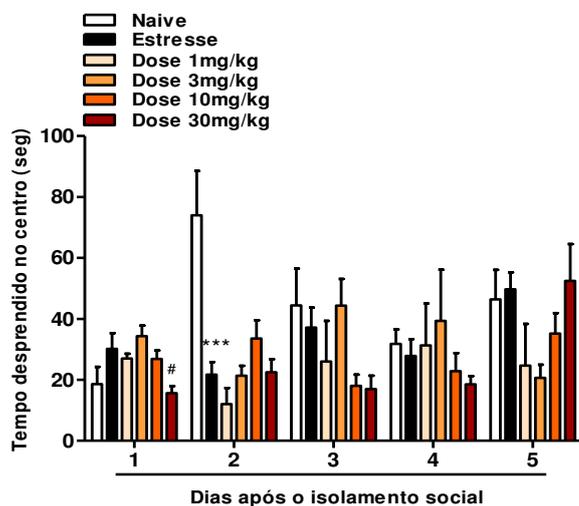


Figura 7: Tempo desprendido na periferia (A) e tempo desprendido no centro (B) durante os 5 minutos de teste, em animais sem tratamento, e animais tratados com as doses de 1, 3, 10 e 30 mg/kg da fração diclorometano da *Pfaffia glomerata* (Spreng) *Pedersen* e submetidos ao isolamento social. Cada barra vertical representa a média dos animais e os pontos na horizontal mostram os dias após o isolamento social. *** $P < 0.001$ indica a diferença significativa do grupo Naive em comparação com o grupo Estresse. # $P < 0.05$ indica a diferença significativa do grupo Estresse em comparação aos grupos tratados com as doses de 1, 3, 10 e 30 mg/kg da fração diclorometano da *Pfaffia glomerata* (Spreng) *Pedersen*. ANOVA de uma via seguida de pós-teste Dunnet.

Na figura 7A é possível observar um aumento no tempo desprendido na periferia no dia 2, causada pela exposição ao modelo de estresse agudo. Ainda é possível observar que o tratamento com a fração diclorometano da *Pfaffia glomerata* (Spreng) *Pedersen*, nas doses de 30 mg/kg aumenta ainda mais esse tempo na periferia no dia 1 e 3. Na figura 7B é possível observar uma diminuição no tempo desprendido no centro no dia 2, causado pela exposição ao modelo de estresse agudo. Ainda, é possível observar que o tratamento com a fração diclorometano da *Pfaffia glomerata* (Spreng) *Pedersen*, na dose de 30 mg/kg foi capaz de diminuir ainda mais esse tempo no centro nos dias 1 e 3 após o estresse.

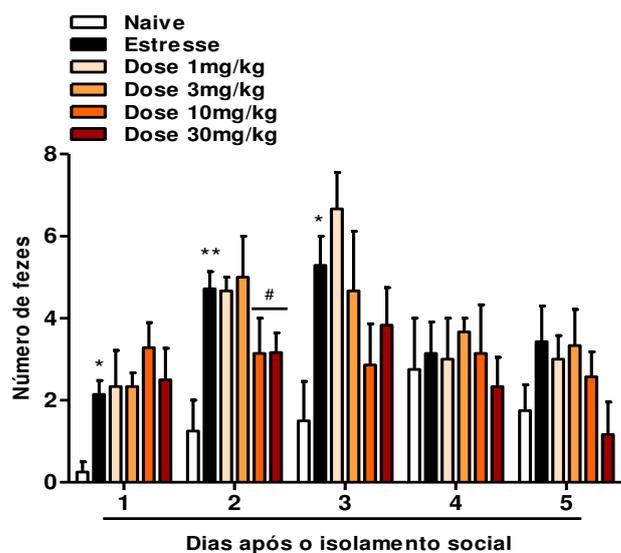


Figura 8: Número de fezes realizadas durante os 5 minutos do teste de campo aberto, pelos animais sem tratamento, e animais tratados com as doses de 1mg/kg, 3 mg/kg, 10 mg/kg e 30 mg/kg da fração diclorometano da *Pfaffia glomerata* (Spreng) *Pedersen* e submetidos ao isolamento social. Cada barra vertical representa a média dos animais e os pontos na horizontal mostram os dias após o isolamento social. * $P < 0.05$ e ** $P < 0.01$ indica a diferença significativa do grupo naive em comparação com o grupo estresse. # $P < 0.05$ indica a diferença significativa do grupo estresse em comparação aos grupos tratados com as doses de 1, 3, 10 e 30 mg/kg da fração de diclorometano da *Pfaffia glomerata* (Spreng) *Pedersen*. ANOVA de uma via seguida de pós-teste Dunnet.

Na figura 8 é possível observar um aumento no número de fezes nos dias 1 a 3 causada pela exposição ao modelo de estresse agudo. Ainda é possível observar que o tratamento com a fração diclorometano da *Pfaffia glomerata* (Spreng) *Pedersen*, nas doses de 10 e 30 mg/kg diminui número de fezes no dia 2 após o estresse no experimento de campo aberto.

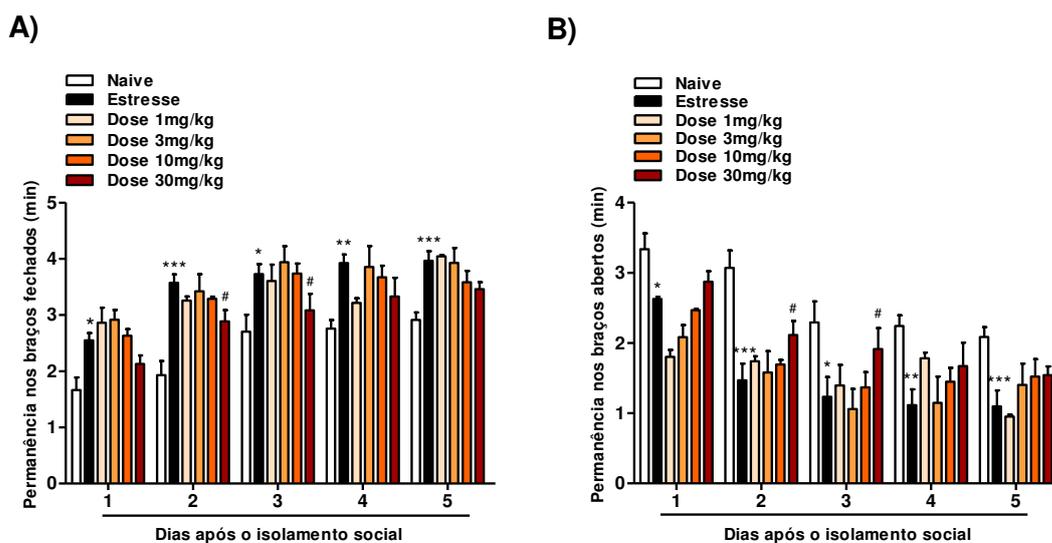


Figura 9: Tempo despendido nos braços fechados (A) e aberto (B) durante os 5 minutos de teste, em animais sem tratamento, e animais tratados com as doses de 1, 3, 10 e 30 mg/kg da fração diclorometano da *Pfaffia glomerata* (Spreng) *Pedersen* e submetidos ao isolamento social. Cada barra vertical representa a média dos animais e os pontos na horizontal mostram os dias após o isolamento social. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ e *** $P < 0.001$, indicam a diferença significativa do grupo naive em comparação com o grupo estresse. # $P < 0.05$ indica a diferença significativa do grupo estresse em comparação aos grupos tratados com as doses de 1, 3, 10 e 30 mg/kg da fração de diclorometano da *Pfaffia glomerata* (Spreng) *Pedersen*. ANOVA de uma via seguida de pós-teste Dunnet.

Na figura 9A é possível observar um aumento gradual da permanência nos braços fechados durante todos os dias, causada pela exposição ao modelo de estresse agudo. Ainda, é possível observar a diminuição desse tempo despendido nos braços fechados, nos dias 2 e 3, entre os animais expostos ao modelo de estresse agudo não tratados e os animais expostos ao modelo de estresse agudo e tratados com a fração diclorometano da *Pfaffia glomerata* (Spreng) *Pedersen*, na dose de 30 mg/kg. Na figura 9B é possível observar uma diminuição gradual da permanência nos braços abertos durante todos os dias, causada pela exposição ao modelo de estresse agudo. Ainda, é possível observar um aumento desse tempo despendido nos braços abertos, nos dias 2 e 3, entre os animais expostos ao modelo de estresse agudo e os animais expostos ao modelo de estresse agudo e tratados com a fração diclorometano da *Pfaffia glomerata* (Spreng) *Pedersen*, na dose de 30 mg/kg no labirinto em cruz elevado.

6.1.6 Efeito protetor da fração diclorometano da *Pfaffia glomerata* (Spreng) *Pedersen* sobre o comportamento depressivo em camundongos expostos a um modelo de estresse agudo

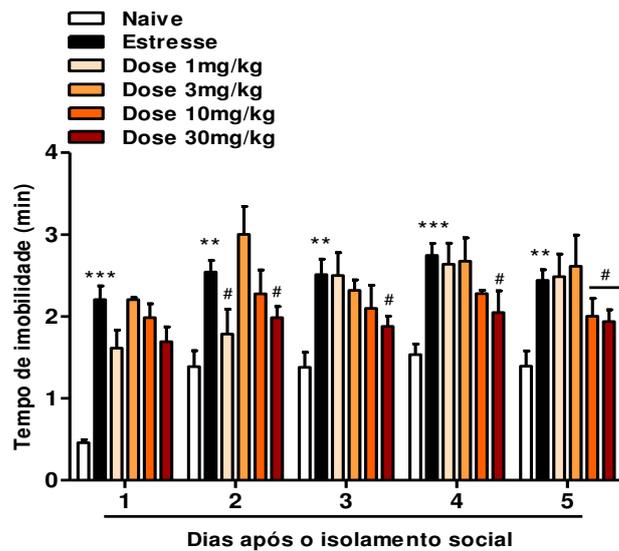


Figura 10: Tempo de imobilidade durante os 5 minutos de teste, em animais sem tratamento, e animais tratados com as doses de 1, 3, 10 e 30 mg/kg da fração diclorometano da *Pfaffia glomerata* (Spreng) *Pedersen* e submetidos ao isolamento social. Cada barra vertical representa a média dos animais e as barras horizontais mostram os dias após o isolamento social. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ e *** $P < 0.001$, indicam a diferença significativa do grupo naive em comparação com o grupo estresse. # $P < 0.05$ indica a diferença significativa do grupo estresse em comparação aos grupos tratados com as doses de 1, 3, 10 e 30 mg/kg da fração de diclorometano da *Pfaffia glomerata* (Spreng) *Pedersen*. ANOVA de uma via seguida de pós-teste Dunnet.

Na figura 10 é possível observar um aumento no tempo de imobilidade do animal todos os dias, causada pela exposição ao modelo de estresse agudo. Ainda, é possível observar uma diminuição desse tempo no dia 2 pela dose de 1 mg/kg, no dia 5 pela dose de 10mg/kg, e dos dias 2 a 5 pela dose de 30mg/kg entre os animais expostos ao modelo de estresse agudo e os animais expostos ao modelo de estresse agudo e tratados com a fração diclorometano da *Pfaffia glomerata* (Spreng) *Pedersen*, no nado forçado.

A partir dos resultados obtidos dos experimentos de campo aberto, labirinto em cruz elevado e nado forçado, a dose que obteve maior efeito protetor foi a dose de 30mg/kg, assim, a mesma foi utilizada nos experimentos de preferência a sacarose e reconhecimento de objeto.

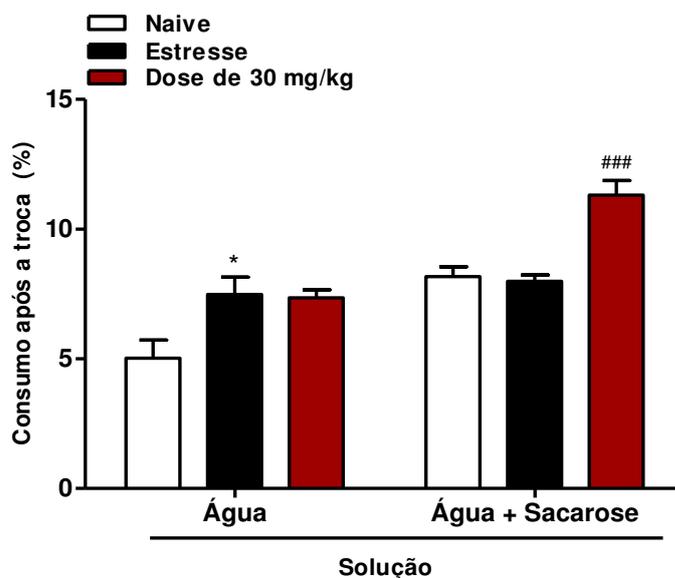


Figura 11: Porcentagem de água e água com sacarose consumida pelos grupos de camundongos em naive, comparados com os animais submetidos ao isolamento social sem tratamento, calculado pela equação $VS/VT * 100$. Cada barra vertical representa a média de 5 animais de cada grupo e os pontos horizontais mostram os dias após o isolamento social. * $P < 0.05$ indica a diferença significativa do grupo naive em comparação com o grupo estresse. ### $P < 0.001$ indicam a diferença significativa do grupo estresse em comparação ao grupo tratado com a dose de 30 mg/kg da fração diclorometano da *Pfaffia glomerata* (Spreng) Pedersen. Teste t seguido de pós-teste Mann-Whitney e ANOVA de uma via seguida de pós-teste Dunnet.

Na figura 11 é possível observar um aumento no consumo de água causado pela exposição ao modelo de estresse agudo. Ainda, é possível observar que o tratamento com a fração diclorometano da *Pfaffia glomerata* (Spreng) Pedersen, na dose de 30 mg/kg foi capaz de aumentar o consumo de água com sacarose, no experimento de preferência a sacarose.

6.1.7 Efeito protetor do tratamento oral com a fração diclorometano da *Pfaffia glomerata* (Spreng) *Pedersen* sobre a memória em animais expostos a situação de estresse agudo

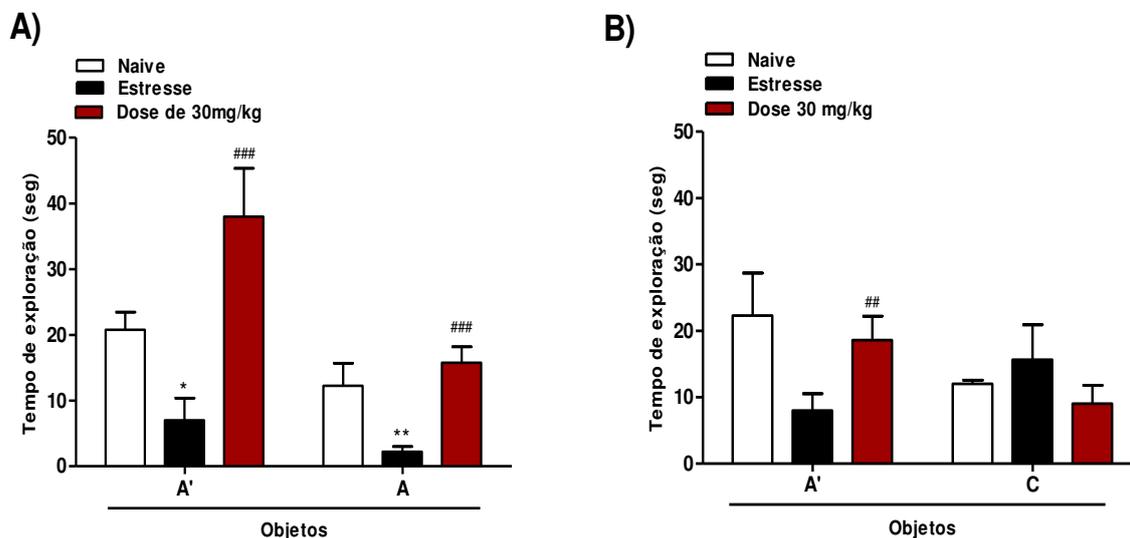


Figura 12: Tempo de exploração de dois objetos idênticos (A) e de objetos diferentes (B) durante os 5 minutos de teste, de animais naive, animais sem tratamento submetidos ao isolamento social, e animais tratados com a dose de 30 mg/kg da fração diclorometano da *Pfaffia glomerata* (Spreng) *Pedersen* e submetidos ao isolamento social. Cada barra vertical representa a média de 5 animais e os pontos horizontais mostram os dias após o isolamento social. * $P < 0.05$ e ** $P < 0.01$ indicam a diferença significativa do grupo naive em comparação com o grupo estresse. ### $P < 0.001$ indica a diferença significativa do grupo estresse em comparação aos grupos tratados com a dose de 30 mg/kg da fração diclorometano da *Pfaffia glomerata* (Spreng) *Pedersen*. Teste t seguido de pós-teste Mann-Whitney e ANOVA de uma via seguida de pós-teste Dunnet.

Na figura 12A é possível observar menor exploração de ambos os objetos idênticos, causada pela exposição ao modelo de estresse agudo. Ainda, é possível observar que o tratamento com a fração diclorometano da *Pfaffia glomerata* (Spreng) *Pedersen*, nas dose de 30 mg/kg foi capaz de aumentar significativamente esse tempo de exploração de ambos os objetos em comparação aos grupos naive e estresse. Na figura 12B é possível observar que não há diferenças significativas causada pela exposição ao modelo de estresse agudo. Contudo, é possível observar maior exploração do objeto previamente apresentado ao animal entre os animais expostos ao modelo de estresse

agudo e os animais expostos ao modelo de estresse agudo e tratados com a fração diclorometano da *Pfaffia glomerata* (Spreng) *Pedersen*, na dose de 30 mg/kg, quando comparados aos grupos naive e estresse no experimento de reconhecimento de objeto

6.1.8 Verificação da ocorrência de efeito do tipo sedação do extrato da *Pfaffia glomerata* sobre a atividade motora do animal

Tratamento	Tempo no rotarod em segundos (latência para a primeira queda)
Veículo (salina)	120±6
Fração diclorometano 30 mg/kg	120±19
Diazepam 10 mg/kg	42±16

Figura 13: Tempo de latência do animal durante os 2 minutos de teste de rotarod tratados com a dose de 30 mg/kg do extrato, comparado com os animais que receberam salina.

É possível observar que não houve diferença no tempo de latência da primeira queda dos animais, além do mesmo apresentar um tempo de latência significativamente maior do que o diazepam, que é o controle positivo.

7. DISCUSSÃO

O estresse é um problema atual extremamente comum, visto que, segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), o estresse acomete cerca de 90% da população mundial, afetando tanto a qualidade de vida, quanto a economia de um país. Além disso, gera outros transtornos como a ansiedade e a depressão (LOURES et al 2002, BAUER 2002). Para o tratamento destas condições a população em geral faz grande uso produtos naturais, devido ao baixo custo, acessibilidade, sendo os produtos naturais uma importante fonte de investigação de novos fármacos devido a variedade de moléculas bioativas (VIEGAS, BOLZANI e BARREIRO 2006). No Brasil os ginsengs são muito utilizados inespecificamente pela população em geral, em chás, para a recuperação de estados debilitantes. Estudos indicam que o composto 20-hidroxi-ecdisona, um fitoesteróide presente no ginseng *Pfaffia glomerata* (Spreng) *Pedersen*, é o responsável pelo efeito adaptógeno, ou seja, capacidade de promover aumento da resistência do

organismo às influências externas e internas (GAVIN 2015; PELOSO 2007; RATES e GOSMANN 2002). Assim, o objetivo desse trabalho foi avaliar a ocorrência de efeitos protetores do tratamento oral com a fração diclorometano da *Pfaffia glomerata* (Spreng) *Pedersen* sobre comportamentos do tipo depressivos e de ansiedade em animais submetidos a um modelo de estresse agudo.

Os camundongos que foram submetidos ao estresse por isolamento social e tratados com a dose de 30 mg/kg diminuíram o número de crossing, o tempo desprendido no centro e o número de fezes no experimento de campo aberto, diminuiu o tempo de permanência nos braços abertos no experimento de labirinto em cruz elevado e diminuiu o tempo de imobilidade no experimento de nado forçado. Assim como não modificou o tempo de latência da primeira queda quando comparado com animais naïve.

O teste de campo aberto é utilizado para estudos de fenômenos cognitivos, assim, quando o animal apresenta alta atividade locomotora, observada como alta atividade exploratória (crossing e rearing) a mesma pode ser relacionada ao desenvolvimento de agitação ou um quadro de estresse. Ainda, um tempo maior de permanência no centro do campo aberto e aumento na atividade de defecação indica ansiedade (ARUDA et al. 2011; CRUZ, LANDEIRA-FERNANDEZ 2012). Nossos resultados indicam que os animais submetidos ao modelo de estresse apresentam alta atividade locomotora, indicando estresse, assim como, alta atividade exploratória e alta atividade de defecação. O tratamento oral com a fração diclorometano da *Pfaffia glomerata* (Spreng) *Pedersen* diminuiu a atividade locomotora, apresentando efeito protetor contra o estresse, e diminuiu o tempo desprendido no centro e o número de fezes, apresentando efeito ansiolítico.

O labirinto em cruz elevado é um teste utilizado para avaliar a tendência natural de roedores de explorar ambientes novos e a aversão dos mesmo à altura e espaços abertos, assim, um animal com altos níveis de ansiedade, apresenta maior permanência nos braços fechados e menor nos braços abertos (ARUDA et al. 2011). Neste sentido, em nossos estudos pudemos observar que os animais expostos ao modelo de estresse agudo apresentaram maior permanência nos braços fechados e menor nos braços abertos, assim como citado anteriormente. Assim, a fração diclorometano da *Pfaffia glomerata* (Spreng) *Pedersen* diminuiu esse tempo de permanência nos braços fechados e

umenta o tempo de permanência nos braços abertos, sugerindo um efeito protetor quanto ao desenvolvimento de ansiedade.

O experimento de nado forçado é um teste comportamental que prediz possível comportamento depressivo do animal, sendo que quanto maior o tempo de imobilidade do animal, maior a predisposição ao comportamento depressivo (POSSAMAI 2013). Nesse sentido, em nossos estudos pudemos observar que os animais expostos ao modelo de estresse agudo apresentaram alto tempo de imobilidade, assim como citado anteriormente. O tratamento com a fração de diclorometano da *Pfaffia glomerata* (Spreng) *Pedersen* diminuiu significativamente esse tempo de imobilidade, sugerindo proteção quanto ao desenvolvimento deste comportamento depressivo.

O teste de preferência a sacarose é um teste utilizado para verificar a ocorrência de anedonia, que é um dos sintomas da depressão, assim, animais que perdem o prazer, não distinguem entre água e água com sacarose, e consomem quantidades iguais ou maiores de água (SIBA 2013). Nesse sentido, em nossos estudos pudemos observar que os animais expostos ao modelo de estresse agudo consumiram quantidades iguais de água e água com sacarose, não sendo observado o desenvolvimento de comportamento do tipo anedonia neste modelo de estresse agudo.

O teste de reconhecimento de objeto é um teste utilizado para avaliar a memória. Baseia-se no comportamento natural do animal de explorar objetos novos, desta forma, o animal é exposto a dois objetos idênticos (primeira exposição), e, em uma segunda exposição um dos objetos é trocado esperando-se que o objeto novo seja alvo de maior interesse exploratório por parte do animal. Uma possível alteração nos parâmetros de memória levaria o animal a não explorar o objeto novo mais do que o objeto que o mesmo já foi exposto pelo fato de não recordar que um dos objetos é novo no ambiente (RAMOS 2011). Em ensaios com alguns tipos de adaptogênicos, foi observado a influência das mesmas na expressão de HSF1 e HSP70, o primeiro é uma proteína que regula a transcrição e o último uma chaperona, que impedem proteínas malformadas, formem agregados. Sendo a inibição de ambos, associada ao acúmulo de placas β -amilóides no cérebro, contribuindo para o quadro de Alzheimer (PANOSSIAN 2017), consequentemente influenciando na memória. Por este motivo o interesse em avaliarmos possíveis efeitos protetores da planta sobre a memória. Contudo, em nossos estudos pudemos observar que os animais expostos ao modelo de estresse agudo exploraram o objeto novo pelo mesmo tempo médio que o objeto antigo. O mesmo foi

observado para o grupo naive, contrariando o que foi citado anteriormente. Assim, o modelo de estresse agudo utilizado não foi capaz de alterar os parâmetros de memória em animais estressados, assim, não é possível verificar o efeito da fração testada, visto que a os animais tratados também foram submetidos a esse modelo. Desta forma, o modelo não foi satisfatoriamente padronizado e alterações no protocolo, como tempo de treino, podem ser realizadas em novos experimentos.

Quando animais estressados foram tratados com 30 mg/kg da fração diclorometano da *Pfaffia glomerata* (Spreng) *Pedersen* pudemos observar uma melhora significativa em diferentes parâmetros de ansiedade e depressão. Visto que, a dose diminuiu o número de crossing do campo aberto, indicando diminuição do comportamento estressado. Também aumentou o tempo desprendido na periferia da caixa no experimento de campo aberto, e nos braços abertos no experimento de labirinto em cruz, quando comparado ao grupo estresse e os demais tratamentos, indicando diminuição do comportamento de ansiedade. A dose de 30 mg/kg diminui significativamente o tempo de imobilidade indicando a diminuição do comportamento depressivo. Em relação a estes efeitos protetores discutidos até aqui, vale observar que a *Pfaffia glomerata* (Spreng) *Pedersen* é amplamente utilizada em chás juntamente com os demais tipos de *Pfaffia*, para efeitos fortificantes, regeneradores, restaurativos, anti-estresse, analgésicos, tranquilizantes, cicatrizantes, anti-inflamatórios, e para melhora da memória, visão e funções cognitivas. Contudo, a maior parte dos estudos acerca da espécie *Pfaffia*, é voltado para a *Pfaffia paniculata*, entretanto, o composto responsável por essas características nessa espécie, é o 20-hidroxi-ecdisona, presente em maior concentração na *Pfaffia glomerata* (RATES e GOSMANN 2002; OLIYNYK e OH 2013). Ensaios utilizando a *Pfaffia glomerata* comprovaram que a mesma apresenta uma atividade depressora do sistema nervoso, e atividade antimicrobiana, em laboratório, assim como melhora no aprendizado e memória em ratos idosos, e melhora em testes cognitivos com ausência de efeitos tóxicos em voluntários idosos, em testes *in vivo* (RATES e GOSMANN 2002). Assim a planta é uma boa opção para o desenvolvimento de medicamentos contra estresse e ansiedade.

A fração de diclorometano da *Pfaffia glomerata* é a que contém o composto 20-hidroxi-ecdisona em maior concentração, sendo o composto, objeto de estudo devido a sua capacidade adaptogênica, ou seja, tem a habilidade de atuar como um regulador metabólico. Estes compostos são descritos como capazes de interferir na resistência do

organismo aos agentes estressores externos ou internos, facilitando a recuperação da homeostase, aumentando a resistência ao estresse, reduzindo os efeitos da primeira fase do mesmo e dificultando a passagem para a fase de exaustão. Este mecanismo é realizado no eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal (HHA), promovendo a estabilização do cortisol (GAVIN 2015). Neste sentido, seria interessante a realização da dosagem dos níveis de corticosterona nestes animais para uma melhor análise dos mecanismos envolvidos nos efeitos protetores da fração de diclorometano da *Pfaffia glomerata*. Outros modelos de estresse agudo são capazes de levar a um aumento dos níveis de corticosterona como parte de seus efeitos deletérios (CONTARTEZE 2007).

Para que um composto seja classificado como um adaptógeno, o mesmo precisa reduzir o dano induzido pelo estresse, apresentando assim, os efeitos de proteção do estresse, tais como antifadiga, atividades anti-infecciosas, antidepressivas e de restauração. Concomitantemente, devem apresentar efeitos estimulantes que aumentam a capacidade de trabalho e desempenho mental diminuindo os efeitos negativos da fadiga e do estresse. Esses efeitos estimulantes não devem esgotar os recursos energéticos dos organismos, com o oxigênio, causando efeitos secundários negativos (OLIYNYK 2013, GAVIN 2015).

8. CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos nos experimentos foi possível concluir que o tratamento oral com a dose de 30 mg/kg foi capaz de diminuir os efeitos do estresse, avaliados pelo desenvolvimento de comportamentos do tipo ansiedade e depressão em camundongos submetidos ao modelo de estresse agudo.

9. REFERÊNCIAS

ALVES, João Luiz, FIGUEIREDO, Maria Henriqueta, CRUZ, Aida, ALVES, Manuel. **Depressão, ansiedade e estresse em usuários de cuidados primários de saúde.** Revista Latino-Americana de Enfermagem. 19 (2): Tela 1-Tela 6, 2011.

ARAÚJO, Sônia Regina Cassiano et al. **Transtornos de ansiedade e exercício físico.** Revista Brasileira de Psiquiatria, v. 29, n. 2, p. 164-171, 2007.

ARRUDA, Eder João, etc al. **Comportamento Exploratório e Ansiolítico de Ratos e Ratas Submetidos à Estimulação Somatossensorial.** Rev Bras Terap e Saúde, 2(1):7-12, 2011.

ATTELE AS, WU JA, YUAN CS. **Ginseng pharmacology: multiple constituents and multiple actions.** BiochemPharmacol 1999;58:1685-1693.

BRAGA, Fernandes et al. **Ansiedade Patológica: Bases Neurais e Avanços na Abordagem Psicofarmacológica.** Revista Brasileira de Ciências da Saúde, v. 14 n. 2 p. 93-100, 2010.

BAUER, Moisés Evandro. **"Estresse."** Ciência hoje, 30.179: p. 20-25, 2002.

CAMELO, Silvia H. Henriques; ANGERAMI, Emília LuigiaSaporiti. **Sintomas de estresse nos trabalhadores atuantes em cinco núcleos de saúde da família.** Revista Latino-Americana de Enfermagem, v. 12, n. 1, p. 14-21, 2004.

CAMPOS, AC et al.. **The anxiolytic effect of cannabidiol on chronically stressed mice depends on hippocampal neurogenesis: involvement of the endocannabinoid system.** Int J Neuropsychopharmacol. 2013. 9:1-13.

CATALAN, Aiane AS et al. **Aditivos fitogênicos na nutrição animal: *Panax ginseng*.** Revta Port. Ciênc. Vet, v. 111, p. 15-21, 2012.

CASTILLO, Ana Regina GL et al . **Transtornos de ansiedade**. Rev. Bras. Psiquiatr., São Paulo, v. 22, supl. 2, p. 20-23, Dec. 2000.

CONTARTEZE, Ricardo Vinicius Ledesma et al . **Biomarcadores de estresse em ratos exercitados por natação em intensidades igual e superior à máxima fase estável de lactato**. Rev Bras Med Esporte, Niterói , v. 13, n. 3, p. 169-174, 2007.

CORADIN, Lidio; SIMINSKI, Alexandre; REIS, Ademir. **Espécies Nativas da Flora Brasileira de Valor Econômico Atual ou Potencial**. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, 2011.

CRUZ, A.P.M., et al.. **Modelos animais de ansiedade e o estudo experimental de drogas serotoninérgicas**. Em: J. landeira-Fernandez e Sérgio Fukusima (org), Métodos em Neurociência. São Paulo: Manole, 192 - 217. 2012.

DOVICH, Selma Sanches. **Estudo dos efeitos dos flavonóides provenientes do quiabo (*Abelmoschus esculentum*) em comportamentos relacionados à ansiedade em camundongos**. 2009. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

FARIAS, Sílvia Maria de Carvalho et al . **Caracterização dos sintomas físicos de estresse na equipe de pronto atendimento**. Rev. esc. enferm. USP, São Paulo , v. 45, n. 3, p. 722-729, Junho 2011.

FILGUEIRAS, Julio Cesar; HIPPERT, Maria Isabel Steinherz. **A polêmica em torno do conceito de estresse**. Psicol. cienc. prof., Brasília, v. 19, n. 3, p. 40-51, 1999.

GARCIA, Yenela; ESQUIVEL, Nashelly. **Comparison of the Response of Male BALB/c and C57BL/6 Mice in Behavioral Tasks to Evaluate Cognitive Function**. Behav. Sci. v. 14, n.8, 2018.

GAVIN, Rejane Salomão et al . **Associação entre depressão, estresse, ansiedade e uso de álcool entre servidores públicos**. SMAD, Rev. Eletrônica Saúde Mental Álcool Drog. (Ed. port.), Ribeirão Preto , v. 11, n. 1, p. 02-09, mar. 2015.

GONTIJO, Cristiana Araújo; CUSTÓDIO, Danyelle Dias. **Fitoterapia em nutrição Clínica**. UNITRI Centro Universitário do Triangulo Mineiro, 2017.

GÜNTHER, Isolda de Araújo; MACHADO, Sonisley Santos. **Revisitando a saúde: da visão patogênica à visão salutogênica de estresse**, 2002.

GUTMAN, Guilherme. **Estresse, ansiedade e depressão; não necessariamente nessa ordem**. Rev. latinoam. psicopatol. fundam., São Paulo , v. 13, n. 2, p. 361-367, June 2010.

LIMA, Maurício Silva de. **Epidemiologia e impacto social**. Rev. Bras. Psiquiatr., São Paulo , v. 21, supl. 1, p. 01-05, May 1999.

LOPES, Claudia S.; FAERSTEIN, Eduardo; CHOR, Dóra. **Eventos de vida produtores de estresse e transtornos mentais comuns: resultados do Estudo Pró-Saúde**. Cad. Saúde Pública, Rio de Janeiro , v. 19, n. 6, p. 1713-1720, Dezembro. 2003.

LOURES, Débora Lopes et al . **Estresse Mental e Sistema Cardiovascular**. Arq. Bras. Cardiol., São Paulo , v. 78, n. 5, p. 525-530, Maio 2002.

MARGIS, Regina, et al. "**Relação entre estressores, estresse e ansiedade**." Revista de Psiquiatria do Rio Grande do Sul v. 25, n. 1, p. 65-74, 2003.

MENDES, Maria Fernanda et al. **Fadiga na forma remitente recorrente da esclerose múltipla**. ArqNeuropsiquiatr, v. 58, n. 2-B, p. 471-5, 2000.

MICHELAN, Clotilde Maria et al . **Imobilidade tônica e imobilidade do nado forçado em cobaias**. Rev. etol., São Paulo, v. 8, n. 2, p. 89-95, dez. 2006.

MONTANARI, Carlos Alberto; BOLZANI, Vanderlan da Silva. **Planejamento racional de fármacos baseado em produtos naturais**. Química Nova, p. 105-111, 2001.

NABATA, Hiroyuki; SAITO, Hiroshi; TAKAGI, Keijiro. **Pharmacological studies of neutral saponins (GNS) of Panaxginseng root**. The JapaneseJournalofPharmacology, v. 23, n. 1, p. 29-41, 1973.

OLIVEIRA, Fernando de. ***Pfaffia paniculata* (Martius) Kuntze: o ginseng-brasileiro**. Rev. bras. farmacogn., São Paulo , v. 1, n. 1, p. 86-92, 1986.

OLIYNYK, Sergiy; OH, Seikwan. **Actoprotective effect of ginseng: improving mental and physical performance**. Journalofginsengresearch, v. 37, n. 2, p. 144, 2013. Organização Mundial da Saúde (OMS). **Relatório sobre a saúde no mundo**. Saúde Mental: Nova Conceção, Nova Esperança, 2001.

PANOSSIAN, Alexander. **Understanding adaptogenic activity: specificity of the pharmacological action of adaptogens and other phytochemicals**. Ann N Y Acad. Sci. 2017 Aug; 1401(1):49-64. doi: 10.1111/nyas.13399. Epub Junho 2017.

PETRIBU, Kátia. **Comorbidade no transtorno obsessivo-compulsivo**. Rev. Bras. Psiquiatr., São Paulo , v. 23, supl. 2, p. 17-20, Outubro. 2001.

PEREIRA, Clarissa Moreira ; SÉRIO, Tereza Maria de Azevedo Pires. **Chronic mild stress: um estudo sobre a interação entre submissão ao protocolo de estressores comopotamento operante e privação**. Rev. Bras de Análise de comportamento. V. 6, n. 1, p. 67 -88, 2010.

PELLOSO, IAO. **Produção e atividade antioxidante de *Pfaffia glomerata*, em função de espaçamentos e arranjos de plantas em duas épocas de colheita**. 2007.

POSSAMAI, Fernanda. **Teste do nado forçado repetido: avaliação dos efeitos da imipramina sobre o comportamento e a neurogênese hipocampal dos ratos alojados em ambiente enriquecido.** Universidade Federal de Santa Catarina, 2013.

RAMOS, Shayenne Eliziane. **Efeito da consição claro/escuro e da intensidade luminosa na aprendizagem e memória de trabalho de camundongos swiss.** Universidade Federal de Juiz de Fora, 2011.

RATES, Stela Maris Kuze; GOSMANN, Grace. **Gênero Pfaffia: aspectos químicos, farmacológicos e implicações para o seu emprego terapêutico.** Revista brasileira de farmacognosia. São Paulo, SP. Vol. 12, n. 2 (jul./dez. 2002), p. 85-92, 2002.

REIS, Ana Lúcia Pellegrini Pessoa dos; FERNANDES, Sônia Regina Pereira; GOMES, Almiralva Ferraz. **Estresse e fatores psicossociais.** Psicol. cienc. prof., Brasília , v. 30, n. 4, p. 712-725, Dezembro 2010.

SADOCK, Benjamin J.; SADOCK, Virginia; RUIZ, Pedro. **Compêndio psiquiatra**, 11 ed, 2016.

SIBA, Isadora Pozzetti. **Avaliação pré-clínica do potencial efeito antidepressivo da miricitrina em modelos animais.** Universidade Federal do Paraná. 2013.

SILVEIRA, Dartiu Xavier; JORGE, Miguel Roberto. **Co-morbidade psiquiátrica em dependentes de substâncias psicoativas: resultados preliminares.** Revista Brasileira de Psiquiatria. Associação Brasileira de Psiquiatria - ABP, v. 21, n. 3, p. 145-151, 1999.

TANIGUCHI, S.F.; BERSANI-AMADO, C.A.; SUDO, L.S.; ASSEF, S.M.C.; OGA, S. **Effect of *Pfaffia irsesinoides* on the experimental inflammatory process in rats.** *Phytoterapy Research*, v. 11, p. 568-571, 1997.

TAKATSU-COLEMAN, Patti, Zanin. **Short-term social isolation induces depressive-like behaviour and reinstates the retrieval of an aversive task: Mood-congruent memory in male mice?** J Psychiatry Neurosci, v. 38, n. 4, 2013.

TENG, Chei Tung; HUMES, E. de C.; DEMETRIO, Frederico Navas. **Depressão e comorbidades clínicas**. Revista de Psiquiatria Clínica, v. 32, n. 3, p. 149-159, 2005.

VIEGAS JR, Cláudio; BOLZANI, Vanderlan da Silva; BARREIRO, Eliezer J. **Os produtos naturais e a química medicinal moderna**. Química Nova, p. 326-337, 2006.

VEIGA JUNIOR, Valdir F.; PINTO, Angelo C.; MACIEL, Maria Aparecida M. **Medicinal plants: safe cure?**. Química Nova, v. 28, n. 3, p. 519-528, 2005.

ZALESKI, Marcos. **Diretrizes da Associação Brasileira de Estudos do Álcool e outras Drogas (ABEAD) para o diagnóstico e tratamento de comorbidades psiquiátricas e dependência de álcool e outras substâncias**. Rev. Bras. Psiquiatr. V.28, n. 2, p.142-148, 2006.

ZANELATI TV, Biojone C, Moreira FA, Guimarães FS, Joca SR. **Antidepressant-like effects of cannabidiol in mice: possible involvement of 5-HT1A receptors**. Br J Pharmacol. v.159 n.1, p122-128, 2010.

ZIMMERMANN, Manfred. **Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals**. Pain, v. 16, n. 2, p. 109-110, 1983.