



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

**EFEITOS DA *Cipura paludosa* NOS DÉFICITS
COMPORTAMENTAIS DE RATOS ADULTOS EXPOSTOS AO
ETANOL E/OU METILMERCÚRIO DURANTE O
DESENVOLVIMENTO DO SNC**

GREICE MARIA RODRIGUES DE SOUZA LUCENA

**Brasília-DF
2010**

GREICE MARIA RODRIGUES DE SOUZA LUCENA

**EFEITOS DA *Cipura paludosa* NOS DÉFICITS
COMPORTAMENTAIS DE RATOS ADULTOS EXPOSTOS AO
ETANOL E/OU METILMERCÚRIO DURANTE O
DESENVOLVIMENTO DO SNC**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, como requisito à obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde.

Orientadora:

Prof^a. Dr^a. Vania Maria Moraes Ferreira

Brasília-DF
2010

Dedicatória Especial

Este trabalho é dedicado com muito carinho à Profa. Dra. Mariangela Soares de Azevedo, que foi a semente de toda esta história. Sem ela, todo esse trajeto de sucesso, talvez, não teria sido possível... Muito obrigada pela colheita dos melhores frutos que tive em minha carreira científica.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho não poderia ter sido realizado sem o auxílio de várias pessoas, as quais agradeço com muito carinho:

- ❖ Primeiramente a Deus por ter me concebido coragem, força, saúde e sabedoria nas horas mais difíceis de minha vida.
- ❖ À Profa. Dra. Vania Ferreira, minha orientadora, pela grande oportunidade da realização da pesquisa e sua preocupação com o meu crescimento científico. Obrigada pela confiança que sempre depositou em mim e por toda a ajuda na construção dos meus conhecimentos.
- ❖ Aos meus pais Florêncio e Vanda, e irmãs Gricia e Gislaine, minha fortaleza, pessoas fundamentais em minha vida, que amo e admiro, e sempre me ensinaram o valor do estudo e da vida... por me fazerem acreditar nos momentos de desalento e incerteza... O meu eterno obrigada!!!
- ❖ Ao meu marido e amigo Márcio, que me acompanha neste meio desde a minha iniciação científica, pelo constante apoio, amor, companheirismo, força e incentivo.
- ❖ À Profa. Dra. Élide Campos, pela forma amiga como sempre escutou as minhas preocupações. Obrigada pela confiança, crescimento e ensinamento na área de bioquímica/estresse oxidativo, a qual me apaixonei.
- ❖ À Profa. Dra. Mariangela Soares de Azevedo, da Universidade Federal de Rondônia, por ter disponibilizado o promissor extrato vegetal da *Cipura paludosa* para a realização deste trabalho e pela parceria e amizade desde o início do meu ingresso no meio científico. Graças a você tive a oportunidade

de conhecer pessoas tão especiais e tão competentes com a quais realizei este trabalho. O meu eterno obrigada!!!

- ❖ Ao Prof. Dr. Adair Roberto Soares dos Santos, da Universidade Federal de Santa Catarina, pela grande amizade, pelas palavras de incentivo e perseverança em vários momentos. Obrigada pelo estímulo e contribuição aos meus conhecimentos, ao longo de toda a minha formação científica. O seu espírito científico é muito motivador. Obrigada por tudo!.
- ❖ Ao Prof. Dr. Rui Daniel Prediger, da Universidade Federal de Santa Catarina, pelos esclarecimentos, disponibilidade e contribuições que foram fundamentais na condução dos trabalhos desta tese. Agradeço também a forma amiga como me recebeu em seu laboratório.
- ❖ Ao Prof. Dr. Valdir Cechinel-Filho pela sua extraordinária competência profissional na identificação dos compostos da *Cipura paludosa* e por suas contribuições em parte deste trabalho.
- ❖ A todos os alunos da Farmácia que participaram deste trabalho, em especial ao João, Fábio, Júlia, Felipe e Wladimy, pela disponibilidade permanente e contribuição grandiosa para a realização deste trabalho, e que me fizeram rir nos momentos de cansaço... o meu muito obrigada!
- ❖ À Profa. Setsuko Noro dos Santos pelo carinho.
- ❖ Às amigas Cristiane Maia e Pollyanna Corrêa, pela amizade e apoio.
- ❖ Ao Sr. Dedé pelos cuidados dos animais no biotério e à Dona Maria pela higienização do laboratório.
- ❖ Aos amigos do Grupo de Estresse Oxidativo, do Laboratório de Biologia Molecular, da Universidade de Brasília: Túlio, Davi, Renata, Viviane, Taynara e Samuel pelo companherismo, amizade, disponibilidade, dedicação e

receptividade de uma maneira tão especial para o desenvolvimento deste trabalho.

- ❖ Agradeço também à Dona Fátima e Ivonildes, do Laboratório de Biologia Molecular, pelo apoio técnico e à Fernanda por manter sempre limpo o nosso ambiente de trabalho.
- ❖ Aos funcionários do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, em especial a Edgrês, pela atenção em todos os momentos.
- ❖ Aos professores da Pós-Graduação em Ciências da Saúde pelos conhecimentos transmitidos.
- ❖ À CAPES pelo apoio financeiro.

Fico grata a todos (amigos, professores, família e colegas) que, de alguma forma, contribuíram na construção deste trabalho.

“Na caminhada da vida, depara-ser-á com muitos espinhos...em sua grande parte dolorosos, grandes e com seus galhos bem retorcidos... Então, inicia-se o convite ao labor da tolerância, da paciência, do perdão e do amor ao próximo. Superados os obstáculos encontrados no caminho, estampa-se o sorriso no rosto, de quem venceu mais uma luta, tornando-se mais fortalecido, sábio e amadurecido e com a certeza do dever cumprido”

(Gislaine Souza)

“Seja você a mudança que quer ver no mundo”

(Mahatma Gandhi)

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	xiv
LISTA DE FIGURAS E GRÁFICOS.....	xviii
RESUMO	xxi
ABSTRACT.....	xxii
I. INTRODUÇÃO GERAL	01
1.1. Susceptibilidade aos agentes neurotóxicos.....	02
1.2. Importância dos estudos envolvendo estresse oxidativo.....	03
1.3. Recursos da Região Amazônica.....	05
II. OBJETIVOS.....	09
2.1. Objetivo geral.....	10
2.2. Objetivos específicos.....	10
CAPÍTULO 1 – Efeitos do tratamento agudo do extrato etanólico da <i>Cipura paludosa</i>.....	11
1. INTRODUÇÃO	12
1.1. Importância dos produtos naturais.....	12
1.2. <i>Cipura paludosa</i>	13
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	15
2.1. Animais.....	15
2.2. Preparação do extrato etanólico da <i>C. paludosa</i> e tratamento.....	16
2.3. Ensaio comportamentais.....	17
2.3.1. Teste da Atividade locomotora espontânea.....	17
2.3.2. Teste do Labirinto em cruz elevado (LCE)	19
2.3.3. Teste do Nado forçado	20

2.3.4. Testes de memória.....	22
a. Reconhecimento social.....	22
b. Esquiva inibitória do tipo “step-down”.....	24
2.4. Análise estatística.....	26
3. RESULTADOS.....	27
3.1. Teste da Atividade locomotora espontânea.....	27
3.2. Teste do LCE.....	28
3.3. Teste do Nado forçado.....	30
3.4. Testes de memória.....	32
a. Reconhecimento social.....	32
b. Esquiva inibitória do tipo “step-down”.....	38
4. DISCUSSÃO.....	42
5. CONCLUSÕES PARCIAIS.....	47

CAPÍTULO 2 – Efeitos da *Cipura paludosa* em ratos adultos expostos ao EtOH durante o período gestacional e lactacional..... 48

1. INTRODUÇÃO	49
1.1. Qual o interesse em se estudar o EtOH?.....	49
- A intoxicação pelo EtOH.....	49
- EtOH x metabolismo e envolvimento no estresse oxidativo.....	50
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	53
2.1. Animais e tratamento.....	53
2.2. Testes comportamentais.....	54
2.3. Testes bioquímicos.....	54
2.3.1. Preparação dos tecidos.....	54

2.3.2. Determinação das atividades enzimáticas.....	55
- Preparo dos extratos proteicos.....	55
- Catalase.....	55
- Glutaciona peroxidase dependente de selênio.....	56
2.3.3. Concentração de proteína.....	58
2.3.4. Indicadores de danos oxidativos.....	58
- Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)...	58
- Peroxidação lipídica pelo método de alaranjado de xilenol.....	60
2.4. Análise estatística.....	61
3. RESULTADOS.....	61
3.1. Teste da Atividade locomotora espontânea.....	61
3.2. Teste do LCE.....	62
3.3. Teste do Nado forçado.....	65
3.4. Testes de memória.....	67
- Reconhecimento social.....	67
- Esquiva inibitória do tipo “ <i>step-down</i> ”.....	71
3.5. Testes bioquímicos.....	72
3.5.1. Atividade de enzimas antioxidantes.....	72
- Catalase.....	72
- Glutaciona peroxidase dependente de selênio.....	76
3.5.2. Indicadores de danos oxidativos.....	78
- Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).....	78
- Peroxidação lipídica pelo método de alaranjado de xilenol.....	82
4. DISCUSSÃO.....	85
5. CONCLUSÕES PARCIAIS	92

CAPÍTULO 3 – Efeitos da <i>Cipura paludosa</i> em ratos adultos expostos ao MeHg durante o período gestacional.....	94
1. INTRODUÇÃO	95
1.1. Qual o interesse em se estudar o MeHg?.....	95
- A intoxicação pelo MeHg x Amazônia.....	95
- MeHg x estresse oxidativo.....	97
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	101
2.1. Animais e tratamento.....	101
2.2. Testes comportamentais.....	102
2.3. Testes bioquímicos.....	102
2.3.1. Preparação dos tecidos.....	102
2.3.2. Determinação das atividades enzimáticas.....	102
- Preparo dos extratos proteicos.....	102
- Atividade de enzimas antioxidantes.....	103
2.3.3. Concentração de proteína.....	103
2.3.4. Indicadores de danos oxidativos.....	103
2.4. Análise estatística.....	103
3. RESULTADOS.....	104
3.1. Teste da Atividade locomotora espontânea.....	104
3.2. Teste do LCE.....	105
3.3. Teste do Nado forçado.....	107
3.4. Testes de memória.....	109
- Reconhecimento social.....	109
- Esquiva inibitória do tipo “ <i>step-down</i> ”.....	112
3.5. Testes bioquímicos.....	113
3.5.1. Atividade de enzimas antioxidantes.....	113

- Catalase.....	113
- Glutathiona peroxidase dependente de selênio.....	117
3.5.2. Indicadores de danos oxidativos.....	119
- Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)...	119
- Peroxidação lipídica pelo método de alaranjado de xilenol.....	123
4. DISCUSSÃO.....	126
5. CONCLUSÕES PARCIAIS.....	137

CAPÍTULO 4 – Efeitos da *Cipura paludosa* em ratos expostos ao EtOH e MeHg no período gestacional e lactacional..... 138

1. INTRODUÇÃO	139
1.1. Qual o interesse em se estudar a associação EtOH+MeHg?.....	139
1.2. Interação EtOH x MeHg: implicações para o SNC	141
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	144
2.1. Animais e tratamento.....	144
2.2. Testes comportamentais.....	145
2.3. Testes bioquímicos.....	145
2.3.1. Preparação dos tecidos.....	145
2.3.2. Determinação das atividades enzimáticas.....	145
- Preparo dos extratos proteicos.....	145
- Atividade de enzimas antioxidantes.....	145
2.3.3. Concentração de proteína.....	146
2.3.4. Indicadores de danos oxidativos.....	146
2.4. Análise estatística.....	146
3. RESULTADOS.....	146

3.1. Teste da Atividade locomotora espontânea.....	146
3.2. Teste do LCE.....	147
3.3. Teste do Nado forçado.....	150
3.4. Testes de memória.....	152
- Reconhecimento social.....	152
- Esquiva inibitória do tipo “ <i>step-down</i> ”.....	156
3.5. Testes bioquímicos.....	157
3.5.1. Atividade de enzimas antioxidantes.....	157
- Catalase.....	157
- Glutathione peroxidase dependente de selênio.....	160
3.5.2. Indicadores de danos oxidativos.....	162
- Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)...	162
- Peroxidação lipídica pelo método de alaranjado de xilenol.....	166
4. DISCUSSÃO.....	169
5. CONCLUSÕES PARCIAIS.....	174
III. DISCUSSÃO GERAL.....	175
IV. CONCLUSÕES FINAIS.....	185
V. PERSPECTIVAS FUTURAS E CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	188
VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	191
VII. ANEXOS.....	213
- Comprovantes CEUA.....	214
- Artigos publicados.....	217

LISTA DE ABREVIATURAS

A	Absorbância
ATP	Trifosfato de adenosina
BHT	Hidroxitolueno butilado
BSA	Albumina de soro bovino
Ca²⁺	Íon cálcio
CAF	Cafeína
CCD	Cromatografia em camada delgada
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
CH₃CHO	Acetaldeído
CH₃CH₂OH	Etanol
CH₃COOH	Ácido acético
CHP	Hidroperóxido de cumeno
CTPM	Canais de transição de permeabilidade mitocondrial
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNAmt	Ácido desoxirribonucleico mitocondrial
DPCPX	1,3-dipropil-8-ciclopentilxantina
DZP	Diazepam
EBA	Entradas nos braços abertos
% EBA	Porcentagem de entradas nos braços abertos
EBF	Entradas nos braços fechados
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EE	Extrato etanólico
E.P.M.	Erro padrão da média

EtOH	Etanol
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FAS	Síndrome Alcoólico-Fetal
Fe₂⁺	Íon ferroso
Fe₃⁺	Íon férrico
FeSO₄	Sulfato de ferro
FM	Faculdade de Medicina
FS	Faculdade de Ciências da Saúde
FXT	Fluoxetina
GPx	Glutaciona peroxidase
GR	Glutaciona redutase
GSH	Glutaciona reduzida
GSSG	Glutaciona oxidada
K_m	Constante de Michaelis
H⁺	Íon hidrogênio
HCl	Ácido clorídrico
H₂O	Água
H₂O₂	Peróxido de hidrogênio
H₂SO₄	Ácido sulfúrico
H₃PO₄	Ácido fosfórico
HO₂[•]	Radical hidroperoxil
HOCl	Ácido hipocloroso
IB	Instituto de Biologia
INPA	Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia
i.p.	intraperitoneal

LCE	Labirinto em cruz elevado
mA	Miliamperes
MCD	Memória de curta duração
MDA	Malondialdeído
MeHg	Metilmercúrio
MEOS	Sistema microsomal de oxidação do etanol
MIX	Administração combinada
MLD	Memória de longa duração
NaCl	Cloreto de sódio
NAD⁺	Nicotinamida adenina dinucleotídeo oxidada
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida
NADP⁺	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidada
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida
NaN₃	Azida sódica
NH₂	Amina
NMDA	<i>N</i> -metil-D-aspartato
nm	nanômetro
NO	Óxido nítrico
O₂	Oxigênio
O₂^{•-}	Radical superóxido
¹O₂	Oxigênio singlet
O³	Ozônio
OH[•]	Radical hidroxil
OMS	Organização Mundial de Saúde
ONOO⁻	Peroxinitrito

PBS	Solução tamponada com fosfato
p/v	Peso/volume
RO[•]	Radical alquoxil
RO₂[•]	Radical peroxil
seg	Segundos
-S-S-	Ponte dissulfeto
Se-GPX	Glutationa peroxidase dependente de selênio
-SH	Grupo tiol
SN	Sistema nervoso
SNC	Sistema nervoso central
SNP	Sistema nervoso periférico
%TBA	Porcentagem de tempo de permanência nos braços abertos
TBA	Tempo de permanência nos braços abertos
TBARS	Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico
TBF	Tempo de permanência nos braços fechados
UFSC	Universidade Federal de Santa Catarina
UnB	Universidade de Brasília
UNIR	Universidade de Federal de Rondônia
UNIVALI	Universidade do Vale do Itajaí
v.o.	Via oral
v/v	Volume/volume
ZM241385	4-(2-[7-amino-2-(2-furil)]1,2,4-triazolo-[2,3-a][1,3,5]triazin-5-ilamino)etil)fenol
μl	microlitro

LISTA DE FIGURAS E GRÁFICOS

Figura 1: Flores (A) e bulbos (B) da <i>C. paludosa</i>	6
Figura 2: Naftoquinonas e naftopirano isolados dos bulbos da <i>C. paludosa</i>	14
Figura 3: Etapas da coleta da <i>C. paludosa</i> aos testes farmacológicos.....	16
Figura 4: Esquema do aparato utilizado para o teste do campo aberto.....	18
Figura 5: Esquema do aparato utilizado para o teste do LCE.....	19
Figura 6: Esquema do aparato utilizado para o teste do nado forçado.....	21
Figura 7: Esquema do aparato utilizado para o teste de memória social.....	22
Figura 8: Esquema do aparelho de esquiva inibitória do tipo “ <i>step-down</i> ”.....	25
Figura 9: Esquema do ciclo do mercúrio.....	96
Gráfico 1: <i>C. paludosa</i> (agudo): atividade locomotora.....	28
Gráfico 2: <i>C. paludosa</i> ou DZP (agudo): LCE.....	29
Gráfico 3: <i>C. paludosa</i> ou FXT (agudo): nado forçado.....	31
Gráfico 4: <i>C. paludosa</i> ou CAF (agudo): reconhecimento social - 120 min.....	32
Gráfico 5: <i>C. paludosa</i> ou CAF (agudo): reconhecimento social - 120 min.....	33
Gráfico 6: <i>C. paludosa</i> e/ou CAF (agudo): reconhecimento social.....	34
Gráfico 7: <i>C. paludosa</i> ou antagonistas de receptores A ₁ ou A _{2A} (agudo): reconhecimento social.....	36
Gráfico 8: <i>C. paludosa</i> ou antagonistas de receptores A ₁ ou A _{2A} (agudo): esquiva inibitória.....	38
Gráfico 9: Naftoquinonas da <i>C. paludosa</i> antagonistas de receptores A ₁ ou A _{2A} (agudo): esquiva inibitória.....	41

Gráfico 10: <i>C. paludosa</i> (crônico) x EtOH: atividade locomotora.....	62
Gráfico 11: <i>C. paludosa</i> (crônico) x EtOH: LCE.....	64
Gráfico 12: <i>C. paludosa</i> (crônico) x EtOH: nado forçado.....	66
Gráfico 13: <i>C. paludosa</i> (crônico) x EtOH: reconhecimento social – 30 min.....	68
Gráfico 14: <i>C. paludosa</i> (crônico) x EtOH: reconhecimento social – 120 min....	70
Gráfico 15: <i>C. paludosa</i> (crônico) x EtOH: esquiva inibitória.....	72
Gráfico 16: <i>C. paludosa</i> (crônico) x EtOH: catalase (tecidos cerebrais).....	74
Gráfico 17: <i>C. paludosa</i> (crônico) x EtOH: catalase (tecido de fígado).....	75
Gráfico 18: <i>C. paludosa</i> (crônico) x EtOH: Se-GPx (tecidos cerebrais).....	77
Gráfico 19: <i>C. paludosa</i> (crônico) x EtOH: Se-GPx (tecido de fígado).....	78
Gráfico 20: <i>C. paludosa</i> (crônico) x EtOH: TBARS (tecidos cerebrais).....	80
Gráfico 21: <i>C. paludosa</i> (crônico) x EtOH: TBARS (tecido de fígado).....	81
Gráfico 22: <i>C. paludosa</i> (crônico) x EtOH: xilenol (tecidos cerebrais).....	83
Gráfico 23: <i>C. paludosa</i> (crônico) x EtOH: xilenol (tecido de fígado).....	84
Gráfico 24: <i>C. paludosa</i> (crônico) x MeHg: atividade locomotora.....	104
Gráfico 25: <i>C. paludosa</i> (crônico) x MeHg: LCE.....	106
Gráfico 26: <i>C. paludosa</i> (crônico) x MeHg: nado forçado.....	108
Gráfico 27: <i>C. paludosa</i> (crônico) x MeHg: reconhecimento social.....	110
Gráfico 28: <i>C. paludosa</i> (crônico) x MeHg: reconhecimento social.....	111
Gráfico 29: <i>C. paludosa</i> (crônico) x MeHg: esquiva inibitória.....	113
Gráfico 30: <i>C. paludosa</i> (crônico) x MeHg:catalase (tecidos cerebrais).....	115

Gráfico 31: <i>C. paludosa</i> (crônico) x MeHg: catalase (tecido de fígado).....	116
Gráfico 32: <i>C. paludosa</i> (crônico) x MeHg: Se-GPx (tecidos cerebrais).....	118
Gráfico 33: <i>C. paludosa</i> (crônico) x MeHg: Se-GPx (tecido de fígado).....	119
Gráfico 34: <i>C. paludosa</i> (crônico) x MeHg: TBARS (tecidos cerebrais).....	121
Gráfico 35: <i>C. paludosa</i> (crônico) x MeHg: TBARS (tecido de fígado).....	122
Gráfico 36: <i>C. paludosa</i> (crônico) x MeHg: xilenol (tecidos cerebrais).....	124
Gráfico 37: <i>C. paludosa</i> (crônico) x MeHg: xilenol (tecido de fígado).....	125
Gráfico 38: <i>C. paludosa</i> (crônico) x EtOH+MeHg: atividade locomotora.....	147
Gráfico 39: <i>C. paludosa</i> (crônico) x EtOH+MeHg: LCE.....	149
Gráfico 40: <i>C. paludosa</i> (crônico) x EtOH+MeHg: nado forçado.....	151
Gráfico 41: <i>C. paludosa</i> (crônico) x EtOH+MeHg: reconhecimento social.....	153
Gráfico 42: <i>C. paludosa</i> (crônico) x EtOH+MeHg: reconhecimento social.....	155
Gráfico 43: <i>C. paludosa</i> (crônico) x EtOH+MeHg: esquiva inibitória.....	156
Gráfico 44: <i>C. paludosa</i> (crônico) x EtOH+MeHg:catalase (tecidos cerebrais)..	158
Gráfico 45: <i>C. paludosa</i> (crônico) x EtOH+MeHg: catalase (tecido de fígado)..	159
Gráfico 46: <i>C. paludosa</i> (crônico) x EtOH+MeHg: Se-GPx (tecidos cerebrais)..	161
Gráfico 47: <i>C. paludosa</i> (crônico) x EtOH+MeHg: Se-GPx (tecido de fígado)...	162
Gráfico 48: <i>C. paludosa</i> (crônico) x EtOH+MeHg: TBARS (tecidos cerebrais)..	164
Gráfico 49: <i>C. paludosa</i> (crônico) x EtOH+MeHg: TBARS (tecido de fígado)....	165
Gráfico 50: <i>C. paludosa</i> (crônico) x EtOH+MeHg: xilenol (tecidos cerebrais)....	167
Gráfico 51: <i>C. paludosa</i> (crônico) x EtOH+MeHg: xilenol (tecido de fígado).....	168

RESUMO

A exposição fetal ao etanol (EtOH) e metilmercúrio (MeHg) ocorre em uma frequência elevada em todo o mundo. Até, então, não há uma terapia eficaz para tratar as consequências comportamentais produzidas por ambos os neurotóxicos. Visto que plantas da medicina tradicional têm sido usadas pelo homem para aliviar uma variedade de doenças, estas também podem ser investigadas como alternativa para aquele problema de saúde. Portanto, o objetivo deste trabalho foi investigar os efeitos do extrato etanólico (EE) obtido dos bulbos da *Cipura paludosa* na locomoção e nos comportamentos de ansiedade, depressão e memória de curta e longa duração, em ratos adultos expostos ao EtOH e/ou MeHg, durante o desenvolvimento do sistema nervoso central (SNC). Adicionalmente, foram medidos em tecidos cortical, hipocámpal, cerebelar e de fígado, enzimas antioxidantes como a catalase (CAT) e a glutatona peroxidase dependente de selênio (Se-GPx) e os níveis de peroxidação lipídica, pelos métodos de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e pelo alaranjado de xilenol. Ratas grávidas Wistar receberam água de torneira ou 6,5 g/kg de EtOH (22,5% p/v) durante a gravidez e amamentação. No 15^o dia de gravidez, os animais de cada grupo foram subdivididos em dois outros para receberem 8 mg/kg de MeHg ou continuarem recebendo água de torneira. Todos os experimentos foram realizados com as proles adultas. Cada grupo recebeu EE da *C. paludosa* (1, 10 ou 100 mg/kg, v.o.) ou salina, administrados cronicamente durante 14 dias. O tratamento com todas as doses do EE melhorou a memória social de curta duração, bem como, na dose de 100 mg/kg, facilitou a retenção da memória de curta e longa duração, em ratos submetidos ao teste da esquiiva inibitória. O EE demonstrou efeitos do tipo antidepressivos e ansiolíticos, sem alterar a atividade locomotora. Além disso, o EE reduziu o comportamento de ansiedade nos grupos de EtOH e MeHg, bem como o comportamento tipo depressivo induzido pelo MeHg e EtOH+MeHg. O EE também mostrou uma melhora na memória social nos animais expostos prenatalmente ao MeHg e/ou EtOH+MeHg além de facilitar a retenção da memória de curta e longa duração nos grupos de EtOH, MeHg ou EtOH+MeHg. Além disso, a exposição aos neurotóxicos diminuiu os níveis de CAT no tecido cortical dos animais do grupo do MeHg e esse efeito foi revertido pelo tratamento crônico com todas as doses do EE da *C. paludosa*. Os níveis de CAT também foram diminuídos no tecido de fígado dos animais do grupo do MeHg, sendo este efeito revertido pelo EE. Uma diminuição significativa dos níveis de Se-GPx foi observada nos tecidos cortical e cerebelar do grupo do EtOH e no tecido cerebelar do grupo do MeHg, sendo esse efeito revertido pelo EE da *C. paludosa*. Os resultados apresentados mostraram um aumento nos níveis de TBARS no grupo EtOH no tecido hipocámpal e no tecido cerebelar nos grupos EtOH, MeHg e EtOH+MeHg. Resultado semelhante foi observado no ensaio de alaranjado de xilenol, exceto no grupo EtOH+MeHg que não apresentou diferença significativa. Além disso, a exposição aos neurotóxicos diminuiu os níveis de CAT no tecido cortical dos animais do grupo do MeHg e esse efeito foi revertido pelo tratamento crônico com todas as doses do EE da *C. paludosa*. Em conjunto, estes resultados sugerem que a intoxicação de EtOH e/ou MeHg durante o desenvolvimento do SNC pode ser um risco para a homeostase celular e conseqüentemente à funções neurocognitivas. Os dados também indicaram que o EE apresenta componentes com propriedades ansiolíticas, antidepressivas, mnemônicas e antioxidantes, cujos mecanismos pelos quais ele produz esses efeitos precisam ser mais bem investigados e devem ser considerados para pesquisas futuras. Assim, os dados deste trabalho confirmam a utilização popular da *C. paludosa* e mostra a potencialidade terapêutica desta planta como um possível fitoterápico.

ABSTRACT

Fetal exposure to ethanol (EtOH) and methylmercury (MeHg) occurs at a high frequency worldwide. So far, there is no effective therapy to treat the behavioral consequences produced by both neurotoxicants. Since traditional medicine has been used by humans to alleviate a variety of diseases, it can be investigated as an alternative for this health issue. The aim of this study is to investigate the effects of ethanolic extract (EE) obtained from bulbs of *C. paludosa* on locomotion and on anxiety, depression-like behaviors and short- and long-term memory of rats exposed to EtOH and/or MeHg during central nervous system (CNS) development. Additionally, the antioxidant enzymes antioxidant catalase (CAT) and selenium-glutathione peroxidase (Se-GPx) and lipid peroxidation levels, by assayed as thiobarbituric acid reactive substances –TBARS) and xynol orange complex methods, were measured in cortical, hippocampal, cerebellar, and kidney tissues. Pregnant Wistar female rats received tap water or 6.5 g/kg of EtOH (22.5% w/v) during pregnancy and breast-feeding. On the 15th day of pregnancy, half of each group received tap water or 8 mg/kg of MeHg. Adult offspring were used in the experiment. Each group received EE of *C. paludosa* (1, 10 or 100 mg/Kg, p.o.) or saline administered chronically for fourteen days. The EE demonstrated anxiolytic- and antidepressant-like effects without changing the locomotor activity. Moreover, EE reduced the anxious behavior in EtOH or MeHg groups, and the depressive behavior in MeHg or EtOH+MeHg groups. The EE also improved the short-term social memory in MeHg or EtOH+MeHg groups and facilitated the retention of short- and long-term memory in EtOH, MeHg or EtOH+MeHg groups. Moreover, the CAT levels were diminished in MeHg group in the cortical tissue and this effect was reversed by chronic treatment with all doses of the EE of *C. paludosa*. The CAT levels were also diminished in the liver tissue in MeHg group and this effect was reversed by EE. A decrease in the Se-GPX levels were observed in EtOH group (cortical), EtOH, MeHg and EtOH+MeHg (cerebellar) tissues. However, in cortical and cerebellar tissues was observed an increase in EtOH+MeHg group. Our results showed increased lipid peroxidation (TBARS) in EtOH group in the hippocampal tissue and in the EtOH, MeHg and EtOH+MeHg groups in the cerebellar tissue compared to control. A same result was observed in the xynol orange assay, except to EtOH+MeHg group that did not have significant difference compared to control. Taken together, the results suggest that EtOH and/or MeHg exposure during CNS development may be a risk for cellular homeostasis and consequently for neurocognitive functions. Our results also demonstrated that EE of *C. paludosa* improved the same behavioral consequences produced by EtOH and/or MeHg contamination. They also indicated that EE components have anxiolytic, antidepressant and mnemonic-like properties, whose mechanisms by which such effects are produced need to undergo investigation and should be considered for future researches. Thus, data from this study confirm the popular use of *C. paludosa* and shows the therapeutic potential of this plant as a possible herbal medicine.

I. INTRODUÇÃO GERAL

1.1. SUSCEPTIBILIDADE DO CÉREBRO EM DESENVOLVIMENTO AOS AGENTES NEUROTÓXICOS

A neurotoxicidade é uma mudança estrutural ou uma alteração funcional do sistema nervoso (SN), resultante da exposição aos agentes químicos, biológicos ou físicos. Em seres humanos adultos, esses agentes têm seus principais efeitos no sistema nervoso periférico (SNP) e, com menor frequência, no sistema nervoso central (SNC), isto porque este último é protegido pela barreira hematoencefálica, a qual previne a passagem de muitos agentes tóxicos endógenos e exógenos ao cérebro. No entanto, quando se trata do SNC em desenvolvimento, este passa a ser muito mais vulnerável aos danos por neurotóxicos do que o SNC de indivíduos adultos (Costa *e cols.*, 2004; Guerri *e cols.*, 2009; May, 2000).

Diversas estruturas do SNC são formadas em diferentes fases do desenvolvimento. A migração celular é um importante processo que ocorre durante o desenvolvimento cerebral, onde os neurônios atingem um local-alvo. O contato entre essas células é importante para a formação dos circuitos neurais que interagem, uns com os outros, para integrar todas as funções centrais. Esta circuitaria complexa, que envolve as comunicações entre as células nervosas, é responsável por todas as atividades que ocorrem no SNC. Quaisquer interferências com a migração celular, como a que ocorre pela presença de neurotóxicos, podem levar aos graves efeitos deletérios no desenvolvimento do cérebro (Castoldi *e cols.*, 2001; LoPachin e Aschner, 1993; Ransom *e cols.*, 2003).

Os vários estágios de desenvolvimento do cérebro humano, os quais apresentam variações na taxa de crescimento entre diferentes mamíferos,

dependem da duração da gravidez (Bayer e cols., 1993; Passingham, 1985). O período da organogênese é marcado por progressivas subdivisões das camadas germinais, resultando na diferenciação rudimentar de órgãos, que poderia representar um estágio particularmente sensível da gravidez aos efeitos teratogênicos. O período organogênico do desenvolvimento em ratos inclui do 7^o-14^o dias gestacionais, que corresponde à 3^a-8^a semanas da gravidez humana (Costa e cols., 2004). Neste período, se dá um intenso desenvolvimento do SNC. Durante esta fase, a exposição a determinados neurotóxicos, como por exemplo o etanol (EtOH) e/ou metilmercúrio (MeHg), pode resultar em retardos do crescimento e anormalidades estruturais cerebrais, que podem se manifestar, entre outros aspectos, por meio de alterações comportamentais (Becker e cols., 1996; Bertossi e cols., 2004; Davidson e cols., 2004).

Vários estudos têm mostrado o efeito do EtOH ou MeHg envolvidos no processo de neurotoxicidade e sua ligação com o estresse oxidativo, por aumentarem a produção das espécies reativas de oxigênio (EROs), como um dos principais fatores desencadeantes das doenças neurodegenerativas (do Nascimento e cols., 2008; Franco e cols. 2007; Roos e cols., 2009; Zima e Kalousová, 2005; Yin e cols. 2007).

1.2. IMPORTÂNCIA DOS ESTUDOS ENVOLVENDO ESTRESSE OXIDATIVO

Radicais livres são definidos como qualquer espécie que contém um ou mais elétrons desemparelhados, capazes de existirem de forma independente (Halliwell e Gutteridge, 1999). O oxigênio no seu estado fundamental apresenta dois elétrons desemparelhados e pode atuar como agente oxidante. Coletivamente, são chamados de EROs os componentes derivados do oxigênio,

tanto radicais - superóxido ($O_2^{\bullet-}$), hidroxil (OH^{\bullet}), peroxil (RO_2^{\bullet}), alquoxil (RO^{\bullet}) e hidroperoxil (HO_2^{\bullet}), quanto não-radicais - peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ácido hipocloroso ($HOCl$), ozônio (O_3), oxigênio singlet (1O_2) e peroxinitrito ($ONOO^-$) (Halliwell e Gutteridge, 1999).

As EROs são geradas por todas as células aeróbicas, como subprodutos de várias reações metabólicas e em resposta aos diferentes estímulos (Aliev *e cols.*, 2008; Bennett *e cols.*, 2009). Sob condições específicas de estresse, os níveis de EROs excedem a capacidade antioxidante da célula, estabelecendo uma condição de desequilíbrio referida como estresse oxidativo (Costa e Moradas-Ferreira, 2001). Esta situação pode derivar-se de uma baixa no sistema de defesa antioxidante decorrente da depleção de componentes de tal sistema ou de mutações que comprometam seu funcionamento. O quadro de estresse oxidativo também pode resultar da produção aumentada de EROs decorrente da exposição aos compostos que as geram e/ou ativam sistemas geradores de EROs e/ou condições de hiperóxia ou, ainda, ambas as condições (Costa e Moradas-Ferreira, 2001).

O equilíbrio no sistema enzimático de defesa antioxidante da célula precisa ser mantido em perfeito funcionamento para garantir a homeostase da célula e, conseqüentemente, do organismo. Muitas desordens neurodegenerativas e neoplasias têm sido relacionadas às disfunções no sistema antioxidante celular (Ballatori *e cols.*, 2009; Bennett *e cols.*, 2009). Diversas doenças humanas têm os radicais livres como componentes etiológicos ou, pelo menos, contribuintes para o seu desenvolvimento. Dentre elas aparecem às doenças neurodegenerativas e as neuropsiquiátricas, como a ansiedade, depressão, doenças de Alzheimer e

Parkinson, entre outras (Berk *e cols.*, 2008; Halliwell 2006; Liu e Schubert, 2009; Ng *e cols.*, 2008).

Evidências, cada vez mais consistentes, sugerem que o estresse oxidativo está envolvido no mecanismo da neurotoxicidade induzida pelo β -amilóide, um peptídeo presente nas células cerebrais, constituindo-se uma característica constante da doença de Alzheimer (Bennett *e cols.*, 2009; Shearer e Szalai, 2008). Além disso, Wei *e cols.* (2009) demonstraram o estresse oxidativo como um dos fatores responsáveis pela depressão em pacientes com câncer colo-retal. Hovatta *e cols.* (2005) mostraram que os genes glioxalase I e glutathione redutase I, envolvidos no processo de estresse oxidativo, são responsáveis pelo comportamento de ansiedade em camundongos. Além disso, estudos recentes têm mostrado a importância de propriedades de espécies vegetais, e seus derivados, no combate aos radicais livres, responsáveis pelo desencadeamento de doenças degenerativas, mediadas por estresse oxidativo (Bai *e cols.*, 2010; Dornas *e cols.*, 2007; Jung *e cols.*, 2009; Lopes-Revuelta *e cols.*, 2006)

1.3. RECURSOS DA REGIÃO AMAZÔNICA

A *Cipura* foi o primeiro gênero descrito por Aublet (1775), o qual foi baseado na *Cipura paludosa* (Figura 1). A *C. paludosa* é uma espécie herbácea conhecida popularmente como alho do mato, alho da campina, alho do campo, cebolinha do campo, coqueirinho, coquinho e vareta (Braga, 1960; Corrêa, 1994) e caracterizada principalmente por seus bulbos carnosos (Goldblatt, 1990, 1998; Goldblatt e Henrich, 1987; Sengupta e Sen, 1988).

O gênero estende-se do Paraguai e parte meridional do Brasil até a parte central do México e Cuba, fazendo parte de uma das riquezas de nossa Amazônia brasileira. Esse gênero apresenta nove espécies: *C. cubensis* Griseb, *C. formosa* Ravenna, *C. gigas* Celis, Goldblatt & Betancur, *C. inornata* Ravenna, *C. insularis* Ravenna, *C. paludosa* Aublet, *C. paradisíaca* Ravenna, *C. rupicola* Goldblatt & Henrich e *C. xanthomelas* Mart. (Celis e cols., 2002; Ravenna, 1988). A *C. paludosa* é a espécie mais amplamente distribuída, enquanto que as outras são de localização restrita (Celis e cols., 2002).

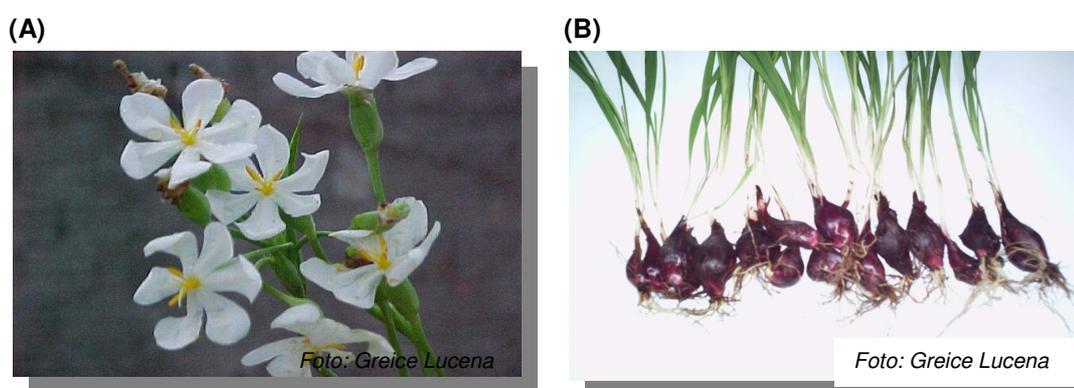


Figura 1: Flores (A) e bulbos (B) da *C. paludosa* Aubl.

O interesse em se estudar a *C. paludosa* se deu a partir de uma viagem ao campo, realizada na Hidrovia do Rio Madeira, em que um espécime deste gênero, encontrado nas comunidades de Cujubim Grande e Itapirema (em Rondônia), foi apontado pela população tradicional ribeirinha como eficaz, na forma de chá, no combate às doenças renais, diarreia, inflamações e processos dolorosos.

Assim, o nosso grupo de pesquisa demonstrou, pela primeira vez, que o extrato etanólico (EE) preparado a partir dos bulbos da *C. paludosa* (Figura 1B) apresentou várias respostas farmacológicas de analgesia de origem central e antiinflamatória, em ratos e camundongos (Lucena e cols., 2007a). Estes resultados confirmaram que a *C. paludosa*, planta utilizada pela população

tradicional ribeirinha de Rondônia para o tratamento da dor e inflamação, realmente era dotada de significativa atividade antinociceptiva (analgésica) e antiinflamatória, quando analisada em diferentes modelos de nocicepção química, térmica e mecânica, em camundongos e/ou ratos.

Resultados posteriores demonstraram que o mesmo extrato de *C. paludosa* também apresentou efeito neuroprotetor sobre a intoxicação decorrente da administração oral de MeHg, em camundongos (Lucena *e cols.*, 2007b). Diante desses dados preliminares, foi possível prever que, talvez, novas perspectivas terapêuticas pudessem estar surgindo no combate aos efeitos deletérios decorrentes da intoxicação pelos neurotóxicos em estudo (EtOH e/ou MeHg).

Atualmente, há grande interesse na terapia e prevenção desses efeitos deletérios produzidos por esses neurotóxicos, e o racional para tais terapias é baseado em algumas premissas. *Primeiro*, o avanço na Neurobiologia tem identificado sistemas de neurotransmissores que contribuem para o início e para a manutenção do consumo de bebida alcoólica. Um entendimento de como mudanças específicas nas funções desses sistemas afeta a susceptibilidade ao álcool, fornece um ponto de partida para o desenvolvimento de medicamentos. *Segundo*, novas drogas que reduzem os efeitos deletérios decorrentes do consumo de álcool e suas associações em animais, podem também reduzir esses efeitos em humanos. *Terceiro*, o desenvolvimento de medicamentos sugere novas perspectivas no avanço de novas farmacoterapias de fontes naturais.

No que se refere às alterações dos processos cognitivos, na atual situação da saúde pública, um dado que gera preocupação e vem alarmando à população, é o aumento progressivo do número de pessoas com doenças

neurodegenerativas, os escassos recursos disponíveis para tratamento adequado e a baixa (ou nenhuma) probabilidade de cura. Os diversos recursos naturais renováveis da Amazônia são um reservatório para a busca de soluções de tratamento (por meio do *screening* de biofármacos) que possam atenuar ou reverter os quadros degenerativos. Modelos experimentais de neuroproteção podem ser usados para investigar algumas dessas riquezas naturais.

Diante da biodiversidade da Amazônia e a enorme riqueza química das plantas, constitui-se um desafio aos pesquisadores da região não só isolar, mas, principalmente, investigar as suas propriedades biológicas, tendo em vista que grande parcela da população utiliza-se de plantas para amenizar seus males. As propriedades medicinais dessas plantas ainda têm os seus usos difundidos apenas com base em observações que a população nativa sempre fez delas (etnofarmacologia).

Com relação a essas alternativas medicinais da Região Amazônica, fazem-se necessários estudos que busquem identificar essas propriedades, podendo vir a contribuir para a descoberta de novas alternativas terapêuticas. Um retorno às populações locais representa melhorias substanciais na qualidade de vida delas.

II. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Investigar os efeitos do EE da *C. paludosa* nas respostas neurocomportamentais e bioquímicas de ratos adultos, expostos ao EtOH e/ou MeHg durante o desenvolvimento do SNC.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Avaliar os efeitos dos tratamentos agudo e crônico do EE da *C. paludosa* nos modelos de locomoção, ansiedade, depressão e memória em ratos adultos;
- ✓ Avaliar o possível envolvimento do sistema adenosinérgico em ratos adultos tratados agudamente com o EE da *C. paludosa*, nos modelos de memória social e espacial do tipo “*step-down*”;
- ✓ Verificar os comportamentos de locomoção, ansiedade, depressão e memória social e espacial de ratos adultos, expostos ao EtOH e/ou MeHg, durante a vida intrauterina e lactacional;
- ✓ Avaliar os sistemas de defesa antioxidante e o dano oxidativo, em tecidos cerebrais e de fígado, dos animais expostos aos neurotóxicos e com a possível ação neuroprotetora do EE da *C. paludosa*.

CAPÍTULO 1

Cipura paludosa

EFEITOS DO TRATAMENTO AGUDO DO EE DA *C. paludosa*

1. INTRODUÇÃO

1.1. Importância dos produtos naturais

A utilização da flora para fins medicinais é uma prática tão antiga quanto à civilização e compõe um dos principais aspectos da medicina tradicional. As plantas medicinais são importantes para muitas comunidades tradicionais, pois, através delas, tratam suas enfermidades. O conhecimento sobre os seus usos, na maioria das vezes, é transmitido de geração em geração. Assim, as plantas formam verdadeiras farmácias naturais, constituídas por plantas nativas e exóticas, que crescem em diversos ambientes. Estudos de novos medicamentos geralmente partem do conhecimento tradicional gerado por estas comunidades.

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), mais de 3,5 bilhões de pessoas no mundo dependem das plantas medicinais para seus cuidados primários de saúde (Balick e Cox, 1993; Bekalo e cols., 2009). No Brasil 20% da população consomem 63% dos medicamentos alopáticos, o restante encontra nos produtos de origem natural, especialmente as plantas medicinais, uma fonte alternativa de medicação (Foglio e cols., 2006). Em todo o mundo, apenas 17% das plantas foram estudadas, de alguma maneira, quanto ao seu emprego medicinal e, na maioria dos casos, sem grande aprofundamento nos aspectos fitoquímicos e farmacológicos (Hostettmann e cols., 2003; Nodari e Guerra, 1999).

As espécies vegetais e seus compostos têm sido utilizados na medicina popular no mundo inteiro, como alternativa no tratamento de várias doenças neurológicas como a ansiedade, depressão e déficits cognitivos em humanos

(Kaschel, 2009; Sarris e Kavanagh, 2009; Thorp e cols., 2009) e em uma variedade de modelos animais (de Araújo e cols., 2009; Kulkarni e Dhir, 2010; Prediger e cols., 2008).

No Brasil, as espécies vegetais endêmicas ou seus extratos são amplamente utilizados com o mesmo objetivo pelas comunidades tradicionais (Kanowski e Hoerr, 1997; Milioli e cols., 2007; Spethmann, 2003; Viana e cols., 2009). Entretanto, só algumas dessas espécies foram avaliadas cientificamente em relação às suas propriedades psíquicas e/ou cognitivas (Blecharz-Klin e cols., 2009; Campos e cols., 2005; Prediger e cols., 2008). O interesse da pesquisa nesta área tem aumentado nos últimos anos onde estão sendo instituídos projetos financiados por órgãos públicos e privados (Foglio e cols., 2006).

Sendo assim, as plantas medicinais possuem propriedades que desempenham um papel fundamental no desenvolvimento e avanço dos estudos modernos, servindo como ponto de partida para o desenvolvimento de novas moléculas líderes.

1.2. *Cipura paludosa*

A *C. paludosa* Aubl. é uma espécie pertencente à grande família Iridaceae, encontrada no norte do Brasil e conhecida pela população tradicional ribeirinha Rondoniense, como “batata-roxa”, entre outras denominações, citadas anteriormente. Estudos do nosso grupo de pesquisa mostraram os efeitos centrais do EE da *C. paludosa*, dotada de significativa atividade antinociceptiva (analgésica) e antiinflamatória quando analisada em diferentes modelos de nocicepção química, térmica e mecânica em camundongos e/ou ratos (Lucena e cols., 2007a).

Posteriormente, foi verificado, *in vivo*, a ação neuroprotetora do EE dos bulbos da planta contra a toxicidade induzida pelo MeHg em camundongos (Lucena e cols., 2007b). Além disso, o tratamento com o EE da *C. paludosa* também aumentou os níveis de glutathiona redutase (GR) no cerebelo desses animais. A GR é uma importante enzima antioxidante envolvida na redução da glutathiona oxidada (GSSG) à glutathiona.

Até o presente momento, o nosso grupo foi o primeiro a demonstrar estudos fitoquímicos e farmacológicos desta planta. Algumas naftoquinonas e naftopiranos têm sido identificados nos bulbos da *C. paludosa* que podem ser responsáveis, pelo menos em parte, por suas propriedades biológicas. Os resultados obtidos por cromatografia em camada delgada (CCD) demonstraram a presença de metabólitos secundários como terpenos e/ou esteróides, alcalóides, quinonas e compostos fenólicos. A fração não-polar (acetona) foi submetida à coluna cromatográfica, revelando três compostos, identificados na base de análise espectral como eleuterina, isoeleuterina e hongconin (Figura 2).

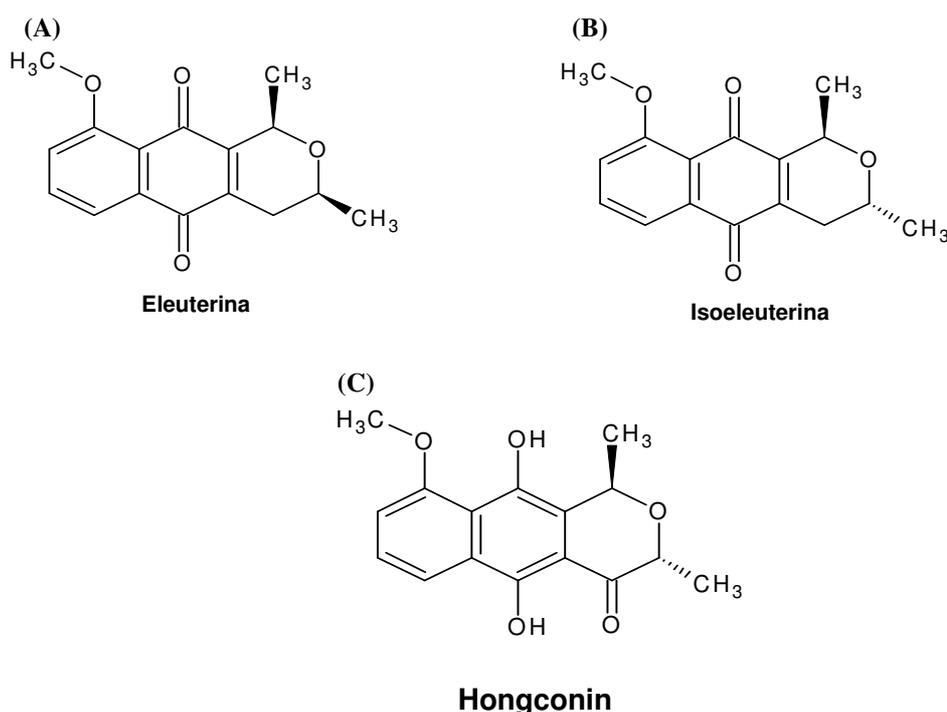


Figura 2: Naftoquinonas (A, B) e naftopirano (C) isolados dos bulbos da *C. paludosa*.

Levando em conta a falta de tratamentos efetivos para déficits neurológicos e sendo a *C. paludosa* usada na medicina tradicional para condições de excitotoxicidade e estresse oxidativo, o presente estudo teve como objetivo demonstrar, *in vivo*, os possíveis efeitos protetores do tratamento agudo do EE da *C. paludosa* e de suas duas naftoquinonas (eleuterina e isoleleuterina) em modelos de ansiedade e depressão, e seus mecanismos de ação em modelos de aprendizado e memória em ratos ou camundongos.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Animais

Para a realização dos testes comportamentais foram utilizados ratos Wistar (n=630) e camundongos Swiss (n=172), machos, com 2,5 meses, provenientes do Biotério da Faculdade de Medicina (FM)/Faculdade de Ciências da Saúde (FS), da Universidade de Brasília (UnB) onde foram alojados em grupos de 5 (ratos) a 20 (camundongos) animais por caixa, mantidos em ciclo claro/escuro de 12 horas e tratados com água e ração *ad libitum*. Todos os critérios estavam de acordo com as normas estabelecidas por Guias de Cuidado e Uso de Animais Laboratoriais.

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso Animal (CEUA), do Instituto de Biologia (IB), da UnB, conforme comprovantes anexados (ver páginas 215 e 216). Os experimentos com camundongos foram realizados em colaboração com o Laboratório do Dr. Rui Prediger do Departamento de Farmacologia, da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

2.2. Preparação do EE da *C. paludosa* e tratamento

O material vegetal foi coletado em Porto Velho, no estado de Rondônia, e identificado por MSc. Maria de Fátima Figueredo Melo, do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA). A excisata foi depositada no herbário Dr. Ary Tupinambá Penna Pinheiro (Porto Velho – RO) sob o nº. 1782. Os bulbos da planta foram lavados, cortados, pesados, obtendo-se 5,5 Kg de material fresco e secos a 40°C, em estufa FANEM, modelo 320–SE (São Paulo, SP), por um período de sete dias, resultando em 3,78 Kg de material seco.

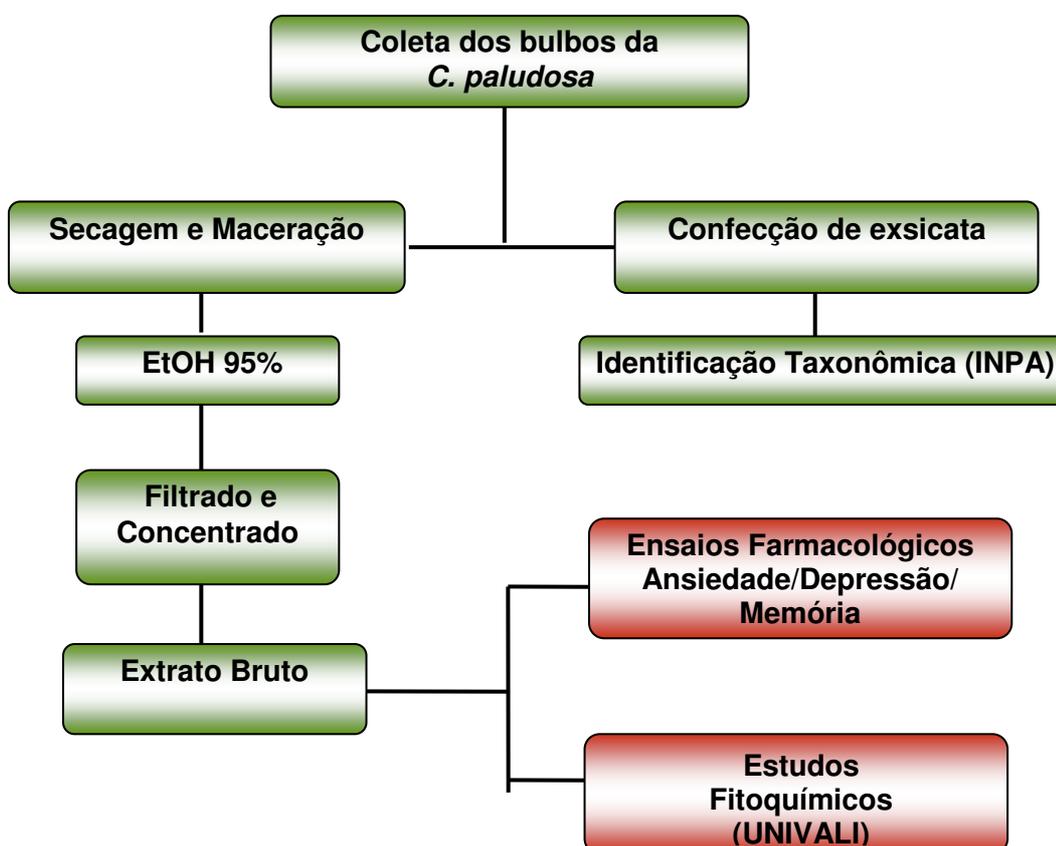


Figura 3: Etapas da coleta da *C. paludosa* até a realização dos testes farmacológicos.

Posteriormente, os bulbos foram macerados e a obtenção do EE foi realizada por meio de extração a frio por percolação, EtOH 95% (v/v) (VETEC). A solução extrativa foi recuperada por filtração e concentrada em evaporador

rotativo FISATOM, mod. 802A (São Paulo, SP, Brasil), obtendo-se 95 g de extrato bruto (Figura 3). Com uma parte do extrato bruto foi realizado testes comportamentais e a outra foi enviada para o Laboratório do Prof. Dr. Valdir Cechinel-Filho, da Universidade do Vale do Itajaí (UNIVALI), Itajaí-SC para a caracterização fitoquímica.

As doses do EE da *C. paludosa* (0,5, 1, 10 ou 100 mg/kg), eleuterina ou isoeleuterina (1, 10 ou 50 mg/kg), antagonistas de receptores específicos de adenosina, como o antagonista de A₁ (DPCPX 0,1 mg/kg) e A_{2A} (ZM241385 0,1 mg/kg), bem como os controles positivos, foram selecionados de acordo com estudos prévios (Prediger e Takahashi, 2005; Prediger e cols., 2008). As substâncias foram administradas pela via intraperitoneal (i.p.) ou oral (v.o.), quando apropriadas, em um volume de 0,1 mL/100 g de peso corpóreo, 30 min (i.p.) ou 1 hora (v.o.) antes dos experimentos.

Como controles positivos para os testes comportamentais, alguns animais receberam diazepam (DZP) (para os testes de ansiedade), fluoxetina (FXT) (para os testes de depressão) ou cafeína (CAF) (para os testes de memória), todos da Sigma Chemical Co., USA, os quais foram dissolvidos em solução salina de cloreto de sódio (NaCl 0,9%). O EE da *C. paludosa* foi dissolvido em NaCl 0,9% contendo tween 80, não excedendo 5%, visando não causar efeito tóxico *per se*.

2.3. Ensaio comportamentais

2.3.1. Teste da Atividade locomotora espontânea

Aparato: Para este teste, foi utilizada uma arena em madeira (60x60x35 cm), onde o chão foi dividido em nove quadrantes iguais de 20x20 cm (Figura 4).

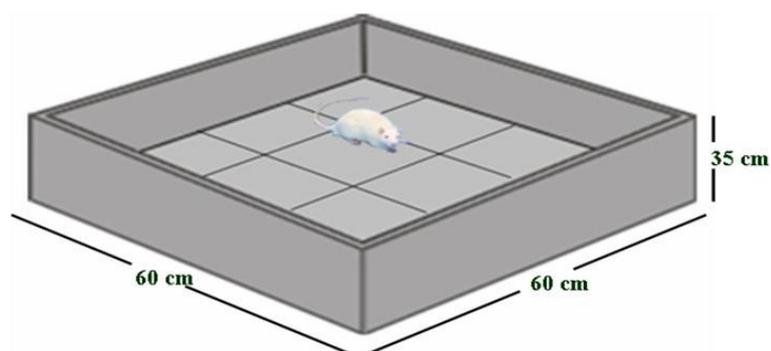


Figura 4: Esquema do aparato utilizado para o teste de campo aberto.

Fundamento: A avaliação de roedores em uma arena ou campo aberto é um procedimento muito utilizado por vários pesquisadores, com a finalidade de se observar a atividade locomotora de animais de pequeno porte. Em um primeiro momento, sabe-se que ratos, assim como os seres humanos, podem reagir ao ambiente considerado “novo” e apresentar uma resposta aversiva, característica de congelamento (do inglês “*freezing*”), que é um comportamento bem típico que, muitas vezes, os animais usam como uma forma de diminuir as detecções visuais e auditivas por parte dos predadores. No entanto, em um segundo momento, ele tende a explorar o ambiente onde se encontra.

Procedimentos experimentais: Antes do início dos experimentos, os animais foram levados ao laboratório por um período de, no mínimo, uma hora, para aclimação e habituação ao ambiente do teste. A atividade locomotora foi considerada quando o animal atravessava com as quatro patas em um dos quadrantes. Cada animal foi testado por um período de 5 min. Todos os experimentos foram conduzidos entre 8:00 e 12:00 h, com o objetivo de evitar as variações circadianas, que poderiam interferir com os resultados experimentais.

2.3.2. Teste do Labirinto em cruz elevado (LCE)

Aparato: É um equipamento em madeira, na forma de cruz, elevado 50 cm do chão, com dois braços fechados (50x10x40 cm) e dois abertos (50x10 cm), opostos entre si (Handley e Mithani, 1984). Uma proteção de acrílico transparente de 1 cm de altura, circunda os braços abertos, objetivando impedir a queda dos animais do LCE (Figura 5).

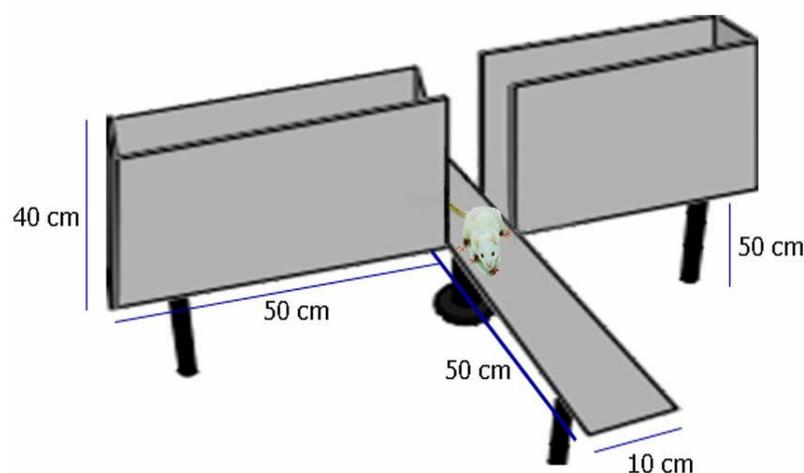


Figura 5: Esquema do aparato utilizado para o teste do labirinto em cruz elevado (LCE).

Fundamento: O LCE é baseado, entre outros fatores, na aversão natural que roedores apresentam pelos braços abertos do labirinto (Montgomery, 1955), pois, quando são forçados a permanecerem nos braços abertos desse aparato, mostram manifestações comportamentais e fisiológicas de medo, tais como congelamento, defecação, e aumento nos níveis de corticosteróides plasmáticos (Pellow e cols., 1985). Como consequência, eles permanecem um tempo maior nos braços fechados. Em uma série de estudos, Treit e cols. (1993) indicaram que o fator de maior contribuição para esta “reação de medo” é a falta das paredes altas dos ramos abertos, que impede a tigmotaxia. A proporção da exploração total nos braços abertos determina uma medida de ansiedade, de tal modo que o

aumento nas percentagens de tempo e de entradas nos braços abertos é considerado como indicativo de ação ansiolítica de drogas (Handley e Mithani, 1984; Pellow *e cols.*, 1985).

Procedimentos experimentais: Cada rato foi posicionado no centro do LCE, com a face voltada para um dos braços fechados e colocado para explorar o equipamento por 5 min. Um observador fez as anotações do número de entradas e do tempo de permanência dos animais nos braços abertos (EBA e TBA, respectivamente) e o número de entradas e o tempo de permanência dos animais nos braços fechados (EBF e TBF, respectivamente). Após observar cada animal, o LCE foi limpo com álcool 10% (v/v). As percentagens de EBA (%EBA) foram calculadas em relação ao número total de entradas nos dois braços e ao tempo de exploração nesses braços, em relação ao tempo total do experimento. O efeito ansiolítico ou ansiogênico foi definido pelo aumento ou diminuição (respectivamente) na proporção das EBA, relativo ao número total de entradas em ambos os braços, e no tempo de exploração naqueles braços, relativo ao tempo total experimental. As percentagens (%) da EBA e TBA foram calculadas de acordo com as fórmulas: $(EBA/EBA+EBF) \times 100$ e $(TBA/TBA+TBF) \times 100$, respectivamente (Pellow *e cols.*, 1985).

2.3.3. Teste do Nado forçado

Aparato: Os animais avaliados no teste do nado forçado (Porsolt *e cols.*, 1977, 1978) foram colocados em um cilindro Plexiglass (30 cm de diâmetro e 50 cm de altura), contendo 40 cm de volume de água a uma temperatura de 23 ± 1 °C por 5 min (Figura 6).

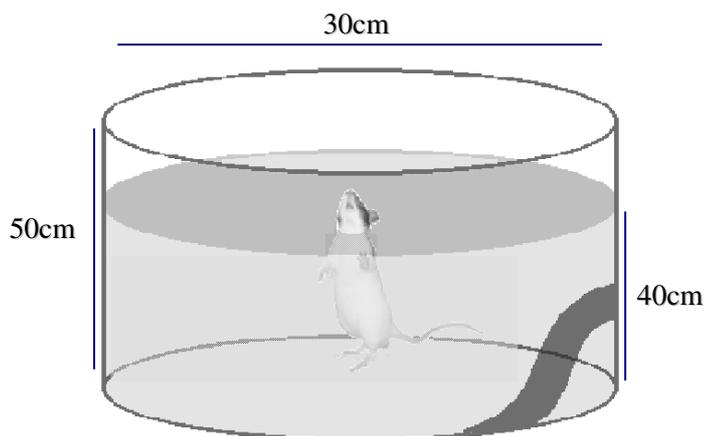


Figura 6: Esquema do aparato utilizado para o teste do nado forçado.

Fundamento: Um perfeito modelo experimental para uso com animais deve ser isomórfico às condições humanas e torna-se útil quando pode ser mostrado que tem uma analogia relevante, ou seja, quando ele revela alguns aspectos de um processo complexo, por meio de hipóteses testadas em humanos (McBride e Li, 1998). Existem duas teorias que envolvem o uso desse teste: uma voltada para avaliação de estresse e outra envolvendo o estado de imobilidade dos animais, que podem representar apatia, caracterizando o estado de depressão. As duas podem ser avaliadas por meio desse modelo, tendo em vista que as reações de fuga e luta são bem caracterizadas (Kirby e Lucki, 1998; Martin e cols., 2000; Redrobe e Bourin, 1998). Este modelo é o mais amplamente utilizado para avaliação farmacológica de atividade antidepressiva (Cryan e cols., 2002).

Procedimentos experimentais: Os ratos exibiram quatro tipos de comportamentos em um tempo de 5 min: *fuga*, que foi observada nos primeiros dois minutos. Nos três últimos foram observados: a *imobilidade contínua* (permanecer flutuando, mantendo somente os movimentos mínimos necessários para manter a cabeça fora da água), o *nado* (circulação em todo o cilindro,

nadando de um quadrante para o outro) e o *climbing* (“subida”, que é definido como movimentos ascendentes ao longo dos lados internos do cilindro). Os dois minutos iniciais (fuga) foram considerados para habituação ao teste. As avaliações foram realizadas por um experimentador que não teve conhecimento prévio a que grupo pertencera cada animal. O aumento do tempo do nado (ou da subida) e a redução do tempo da imobilidade foram definidos como indicativo de comportamentos relacionados à depressão (Cryan e cols., 2002; Kirby e Lucki, 1998).

2.3.4. Testes de memória

- Reconhecimento social

Aparato: Caixas plásticas de acondicionamento de ratos, onde os mesmos foram habituados (Figura 7).

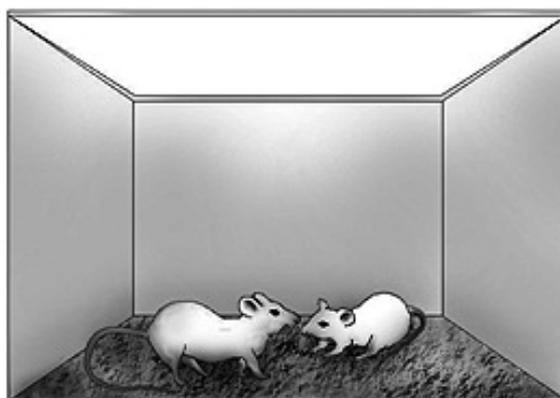


Figura 7: Memória social avaliada no teste de reconhecimento social (Fonte: Prediger, 2010).

Fundamento: O teste de reconhecimento social foi padronizado por Dantzer e cols. (1987) para avaliar memória social de curto prazo. Consiste de duas apresentações sucessivas (5 min cada), separadas por um curto período de tempo onde o rato jovem (25 a 30 dias de nascimento) é colocado na caixa de um

rato adulto. Para se avaliar um possível efeito facilitador da memória, na primeira exposição o rato jovem é exposto ao rato adulto 60 min depois da administração das substâncias ou amostras em estudo.

Durante as exposições, é cronometrado o tempo em que o rato adulto leva para explorar/investigar o rato jovem (cheirar, lambe ou comportamento decorrente de qualquer tipo de aproximação). No final da primeira exposição, o rato jovem é recolocado na sua caixa específica e reexposto ao mesmo animal, 120 min depois. O intervalo de 120 min é usado como uma espécie de janela temporal para testar tratamentos que melhoram a memória.

O que geralmente é aceito nesse tipo de teste é que se o período no qual o animal for avaliado for menor do que 40 min, o rato adulto exibirá reconhecimento do rato jovem, o que será indicado por uma redução significativa no tempo de investigação social, durante a segunda avaliação (Dantzer e cols., 1987; Prediger e Takahashi, 2005). Entretanto, quando o mesmo animal jovem for reexposto por um período mais longo (mais que 60 min) após a primeira apresentação, o rato adulto demorará muito mais tempo para reconhecer o rato jovem, isto é, o tempo de investigação social na segunda apresentação será similar aquele observado na primeira avaliação.

Procedimentos experimentais: Para essa avaliação foram utilizados ratos, machos, com 2 meses (adultos) e com 25 dias a 1 mês (jovens), sendo que esses últimos serviram somente de estímulo social para os animais adultos. Os ratos adultos foram mantidos isolados em caixas plásticas (42x34x17 cm) pelo tempo de sete dias para habituação às novas condições de isolamento. No 7º dia, os animais foram transportados, devidamente cobertos, para o laboratório de

Patologia, da FM, da UnB, onde foram habituados ao novo ambiente por um período mínimo de 1 h, antes dos contatos com os ratos jovens e das administrações dos tratamentos específicos. Tais procedimentos foram importantes para a redução do estresse dos animais e avaliação das substâncias que estavam sendo testadas. Os ratos jovens também foram habituados ao novo ambiente por um período de 1h, mas foram isolados somente 20 minutos antes de começar os experimentos.

Após o período de 1h de habituação, cada rato jovem foi colocado na caixa de um rato adulto, em intervalos de 5 min. Durante essas exposições, foi cronometrado o tempo em que o rato adulto levou para explorar/investigar o rato jovem, sendo que após esse procedimento o jovem retornou à sua caixa e aguardou a próxima re-exposição (após 120 min da primeira exposição).

- Esquiva inibitória do tipo “*step-down*”

Aparato: Utilizou-se o teste da esquiva inibitória do tipo “*step-down*” para avaliação da memória, conforme descrito por Izquierdo *e cols.* (1998) e Roesler *e cols.* (1999). O aparelho de esquiva (EP-104 INSIGHT) consiste em uma caixa de vidro e plástico medindo 50 x 25 x 25 cm com uma plataforma de 5 cm de altura, 8 cm de largura e 25 cm comprimento, e no canto esquerdo apresenta uma série de barras de alumínio, distribuídas com uma distância de 9 cm entre si, que constitui o assoalho da caixa, conectadas a um estimulador elétrico (Figura 8).

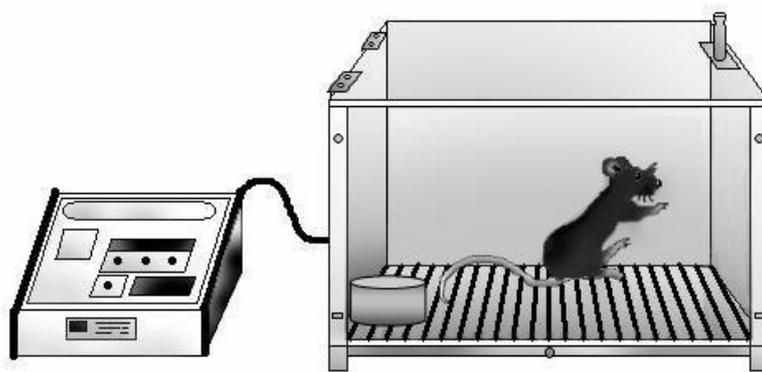


Figura 8: Esquema do aparelho de esquia inibitória do tipo “*step-down*”.

Fundamento: A medida da latência avaliada no teste da esquia inibitória do tipo “*step-down*” tem sido um dos modelos experimentais usado por muitos laboratórios na avaliação dos estudos envolvendo aprendizagem e memória (Izquierdo e cols., 1998; Maia e cols., 2009; Vakili e cols., 2004). O modelo da permite avaliar processos de aprendizagem e memória, tarefas essas que dependem de ativação hipocampal e estão extremamente envolvidas com o sistema glutamatérgico e adenosinérgico (Cammarota e cols., 2004; 2008). Para tal, os parâmetros de avaliação envolvem uma fase de treino e pós-treino e um choque de baixa intensidade, que servirá de estímulo aversivo para que o animal deixe de executar uma determinada tarefa que foi a ele apresentada. Esse procedimento deverá ser lembrado quando da realização de um teste proposto, como mecanismo de retenção da memória.

Procedimentos experimentais: Os procedimentos realizados foram:

- No primeiro dia da análise, os animais foram habituados ao aparato, permanecendo no interior do mesmo por 3 min.

- No segundo dia, os animais foram cuidadosamente colocados na plataforma em frente ao canto esquerdo da caixa de treino, com a face virada para o lado oposto ao do observador e, assim que o animal desceu da plataforma e colocou as quatro patas na grade, recebeu um choque nas patas de 0,4 mA por 1 seg (para ratos) ou 0,3 mA por 2 seg (para camundongos), sendo retirado imediatamente da caixa de treino. Para avaliar camundongos a plataforma era fixada no meio da caixa de treino. A memória de curta duração (MCD) foi investigada no modelo de esquiva inibitória do tipo “*step-down*” 1,5 h após o treino. No teste, o tempo (latência) em que os animais levaram para descer com as quatro patas da plataforma foi utilizado como indicativo de retenção de memória. O intervalo de 180 seg foi padronizado como o tempo máximo de espera (latência) para a descida do animal da plataforma durante as avaliações.
- No terceiro dia, os animais foram novamente colocados cuidadosamente na plataforma em frente ao canto esquerdo da caixa de treino. A memória de longa duração (MLD) foi avaliada no modelo de esquiva inibitória, 24 hr após o treino. No teste, o tempo (latência) em que os animais levaram para descer com as quatro patas da plataforma foi utilizado como indicativo de retenção de memória. O intervalo de 180 seg foi padronizado como o tempo máximo de espera (latência) para a descida do animal da plataforma durante as avaliações.

2.4. Análise estatística

Os dados foram expressos como a média + erro padrão da média (E.P.M.) de 10 animais por grupo. As comparações estatísticas dos resultados foram

realizadas por análise de variância (ANOVA) de uma via e os grupos foram comparados entre si, pelo teste *post-hoc* de Newman-Keuls. A probabilidade aceita como indicativa da existência de diferença estatisticamente significativa foi de $p < 0.05$. Os dados foram analisados utilizando-se o software GraphPad Prism 4® (San Diego, CA). Para a análise dos dados do tempo de latência no teste de esQUIVA inibitória do tipo *step-down* foi realizada uma análise não paramétrica onde foram demonstradas as medianas (com seus intervalos interquartis), de 8-10 animais por grupo, das latências de descida da plataforma e analisados através do teste Kruskal-Walis seguido do teste *post hoc* de Dunn.

3. RESULTADOS

3.1. Teste da Atividade locomotora espontânea

Para este teste, os animais foram tratados com quatro doses do EE da *C. paludosa* (0,5, 1, 10 ou 100 mg/kg), controle salina (10 mL/kg), DZP (1 mg/kg, controle positivo para o teste do LCE), FXT (10 mg/kg, controle positivo para o teste do nado forçado) ou CAF (10 mg/kg, controle positivo para os testes de memória) (Gráfico 1). A ANOVA de uma via não revelou qualquer diferença significativa entre os grupos, quando comparados ao grupo controle ($F_{(7,79)} = 1,255, p=0,2851$).

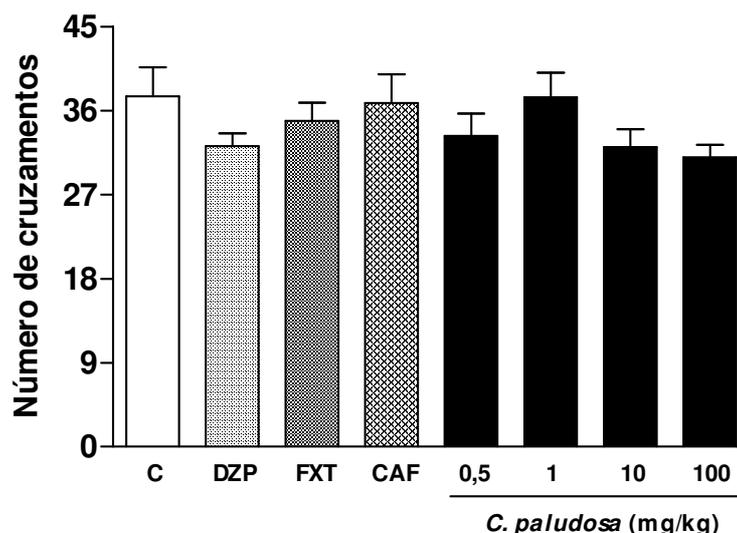


Gráfico 1: Efeito da administração aguda do EE da *C. paludosa* (0,5, 1, 10 ou 100 mg/kg, v.o.) na atividade locomotora de ratos, avaliados durante 5 min no teste do campo aberto. DZP (1 mg/Kg), FXT (10 mg/Kg) ou CAF (10 mg/kg) foram utilizados como controles positivos. Os resultados são expressos como a média \pm E.P.M. de 10 animais por grupo. C=controle, DZP=diazepam, FXT=fluoxetina, CAF=cafeína.

3.2. Teste do LCE

O gráfico 2 A-C, mostra os resultados dos efeitos da administração aguda do EE da *C. paludosa* (1, 10 ou 100 mg/kg, v.o.) ou DZP (1 mg/kg, v.o., controle positivo) na %EBA, %TBA e EBF no LCE. A ANOVA de uma via não revelou qualquer diferença significativa entre os grupos tratados com o EE da *C. paludosa*, quando comparados ao grupo controle tratados com salina. Em contrapartida, o teste da ANOVA, seguida do teste de *post-hoc* de Newman-Keuls, revelou que os animais tratados com o DZP foram capazes de aumentar a %EBA ($F_{(4,49)} = 4,717$, $p < 0,05$) (Gráfico 2 A) e a %TBA ($F_{(4,49)} = 4,413$, $p < 0,05$) (Gráfico 2 B) sem alterar a EBF ($F_{(4,49)} = 3,118$, $p > 0,2851$) (Gráfico 2 C).

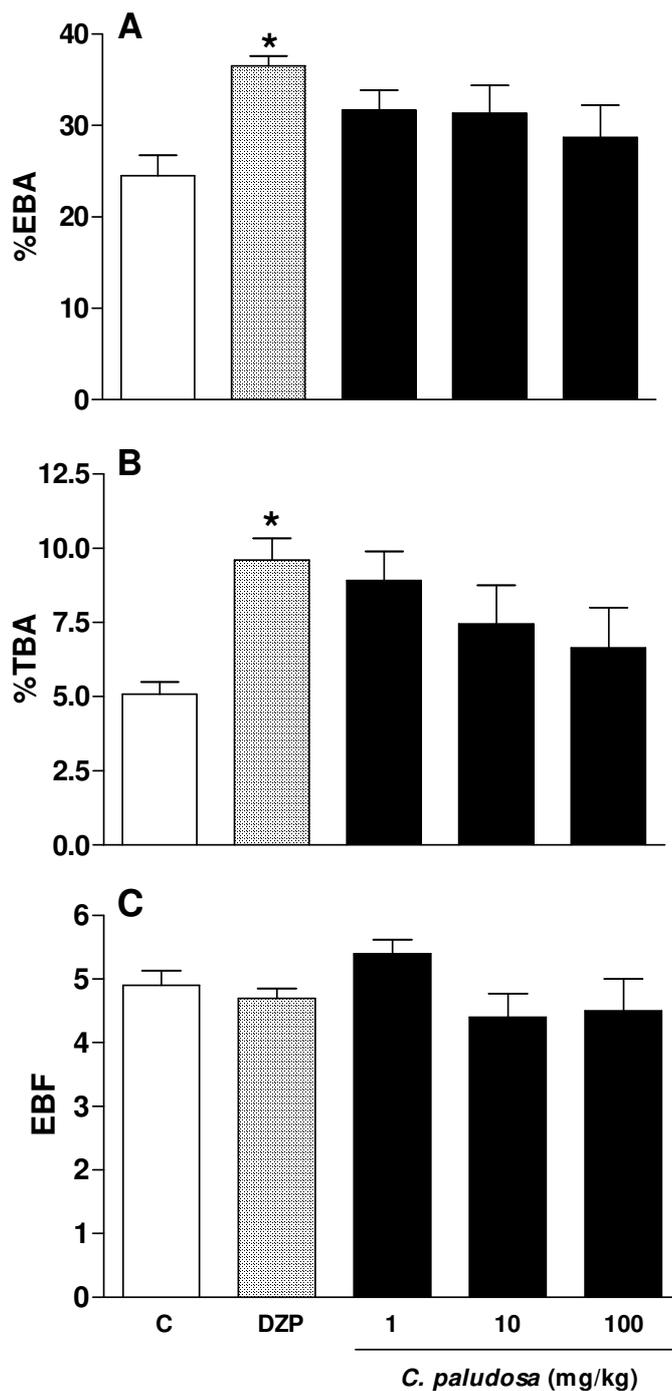


Gráfico 2: Efeito da administração aguda do EE da *C. paludosa* (1, 10 ou 100 mg/kg, v.o.) ou DZP (1 mg/kg, v.o., controle positivo) na percentagem de entradas nos braços abertos (%EAE) (A), percentagem do tempo nos braços abertos (%TBA) (B) e no número de entradas nos braços fechados (EBF) (C) de ratos avaliados no teste do LCE, durante 5 min. Os resultados são expressos como a média ± E.P.M. de 10 animais por grupo. * $p < 0,05$ difere significativamente do grupo controle. (Teste de Newman-Keuls). C=controle, DZP=diazepam.

3.3. Teste do nado forçado

O gráfico 3 A-C, ilustra os resultados do tratamento agudo dos animais com o EE da *C. paludosa* (1, 10 ou 100 mg/kg, v.o.) ou FXT (10 mg/kg, v.o., controle positivo) no comportamento de ratos avaliados no teste do nado forçado. A ANOVA de uma via não revelou nenhuma diferença estatística entre os grupos tratados com o EE da *C. paludosa* no comportamento de subida ($F_{(3,39)} = 0,7061$, $p=0,5547$), nado ($F_{(3,39)} = 0,5094$, $p=0,6783$) ou imobilidade ($F_{(3,39)} = 0,2414$, $p=0,8669$) dos animais, quando comparados ao grupo controle. Entretanto, o teste da ANOVA seguida do teste de Newman-Keuls indicou que os animais tratados com FXT foram capazes de aumentar o comportamento de nado ($F_{(4,49)} = 6,853$, $p<0,001$) (Gráfico 3 B) e imobilidade ($F_{(4,49)} = 7,429$, $p<0,001$) (Gráfico 3 C), sem alterar o comportamento de subida ($F_{(4,49)} = 3,382$, $p>0,05$) dos animais no tanque (Gráfico 3 A).

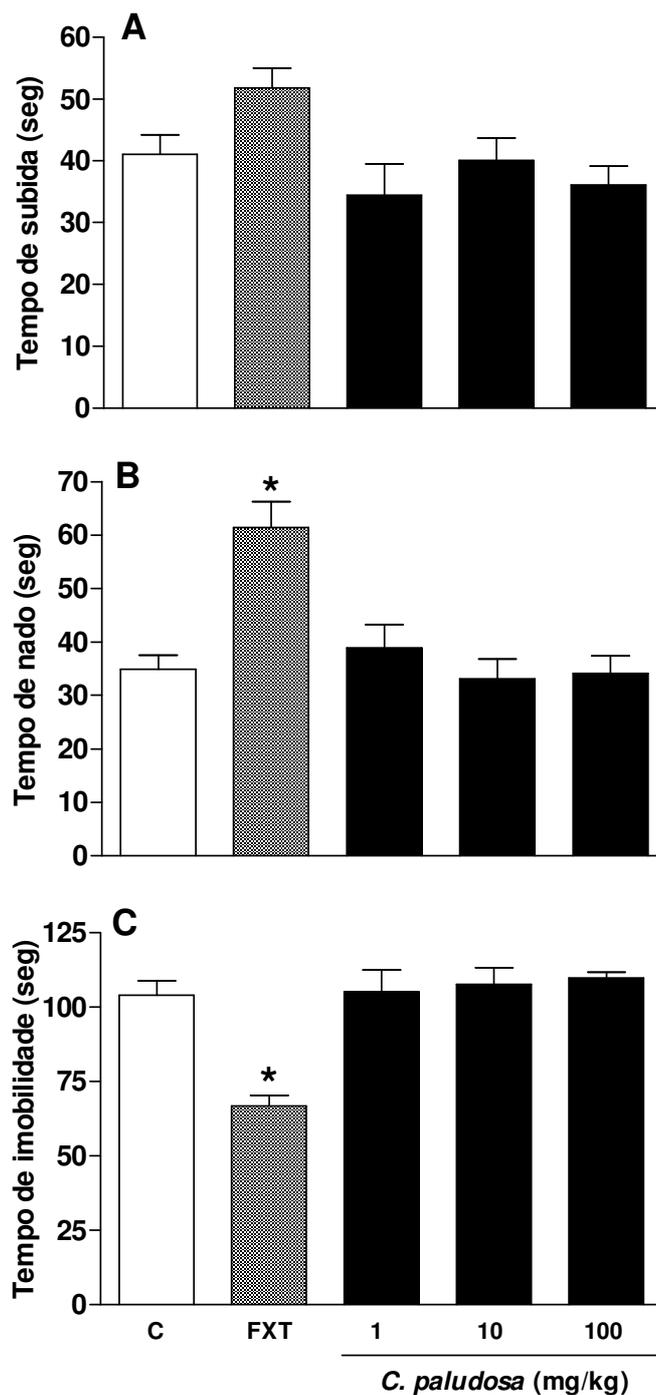


Gráfico 3: Efeito da administração aguda do EE da *C. paludosa* (1, 10 ou 100 mg/kg, v.o.) ou FXT (10 mg/kg, v.o., controle positivo) no comportamento de subida (A), nado (B) e imobilidade (C) de ratos avaliados no teste do nado forçado, durante 3 min. Os resultados são expressos como a média ± E.P.M. de 10 animais por grupo. * $p < 0,05$ difere significativamente do grupo controle. (Teste de Newman-Keuls). C=controle, FXT=fluoxetina.

3.4. Testes de memória

- Reconhecimento social

Os resultados da administração aguda do EE da *C. paludosa* (0,5, 1, 10 ou 100 mg/kg, v.o.) ou CAF (10 mg/kg, v.o., controle positivo) na memória de reconhecimento social de ratos, quando o mesmo rato jovem foi re-exposto depois de um período de 120 min, estão demonstrados no gráfico 4.

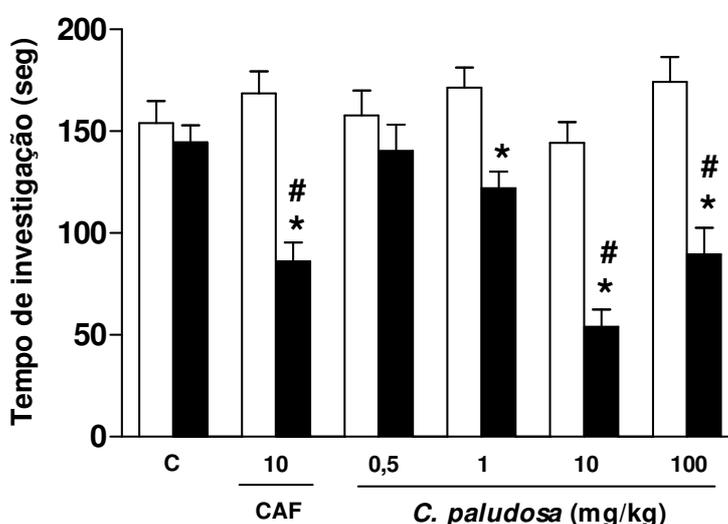


Gráfico 4: Efeito da administração aguda do EE da *C. paludosa* (0,5, 1, 10 ou 100 mg/kg, v.o.) ou CAF (10 mg/kg, v.o., controle positivo) no tempo de investigação social de ratos adultos, quando o mesmo rato jovem foi exposto após um período de 120 min da primeira apresentação. Os resultados são expressos como a média \pm E.P.M. de 10 animais por grupo. As barras representam o tempo de investigação na primeira (barras brancas) e na segunda (barras pretas) apresentação. * $p < 0,05$ difere significativamente, quando comparado à primeira apresentação do mesmo grupo. # $p < 0,05$ difere significativamente, quando comparado à segunda apresentação do grupo controle. (Teste de Newman-Keuls). C=controle; CAF=cafeína.

A ANOVA de uma via revelou um efeito significativo para o tratamento no tempo de investigação na segunda apresentação do rato jovem ($F_{(11,119)}=12,95$; $p < 0,0001$). Posteriormente, o teste de Newman-Keuls mostrou que, nesse tempo, os ratos tratados com o controle e com o EE da *C. paludosa* (0,5 mg/kg) não foram capazes de reconhecer o rato jovem, mostrando uma redução não

significante no tempo de investigação observado durante a segunda apresentação. Os ratos tratados com CAF ou com o EE of *C. paludosa* (1, 10 ou 100 mg/kg) apresentaram uma diminuição no tempo de investigação do rato jovem familiar no “processo de esquecimento” (exposição após 120 min da primeira apresentação), sugerindo um efeito facilitador da memória social (Gráfico 4).

Além disso, conforme demonstrado no gráfico 5, quando um rato jovem, diferente da primeira apresentação, foi usado durante a segunda apresentação, não foi observada uma redução significativa do tempo de investigação ($F_{(11,119)}=0,8668$; $p=0,5747$). Esses resultados sugerem que o EE da *C. paludosa* melhora especificamente a memória social de curto prazo de ratos adultos na doses de 1, 10 ou 100 mg/kg.

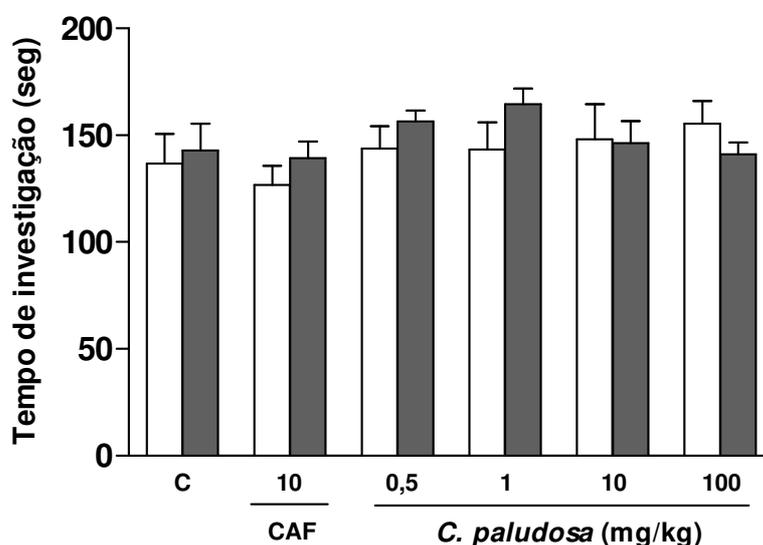


Gráfico 5: Efeito da administração aguda do EE da *C. paludosa* (0,5, 1, 10 ou 100 mg/kg, v.o.) ou CAF (10 mg/kg, v.o., controle positivo) no tempo de investigação social de ratos adultos, quando um rato jovem diferente foi exposto após um período de 120 min da primeira apresentação. Os resultados são expressos como a média \pm E.P.M. de 10 animais por grupo. As barras representam o tempo de investigação na primeira (barras brancas) e segunda (barras pretas) apresentação. C=controle; CAF=cafeína.

Para investigar se o EE possui propriedades facilitadoras da memória, avaliou-se o efeito de doses seletivas de EE da *C. paludosa* (0,5 mg/kg, v.o.) e CAF (1 ou 10 mg/kg, i.p.), quando um mesmo rato jovem foi re-exposto após um período de 120 min da primeira apresentação (Gráfico 6).

A ANOVA de uma via revelou um efeito significativo para o fator de tratamento no tempo de investigação durante a segunda exposição do rato jovem ($F_{(16,141)}=40,72$; $p<0,0001$). Posteriormente, o teste de Newman-Keuls indicou que somente os animais tratados com a dose de CAF (10 mg/kg, i.p.) foram capazes de reconhecer o rato jovem, depois de um período de 120 min da primeira apresentação.

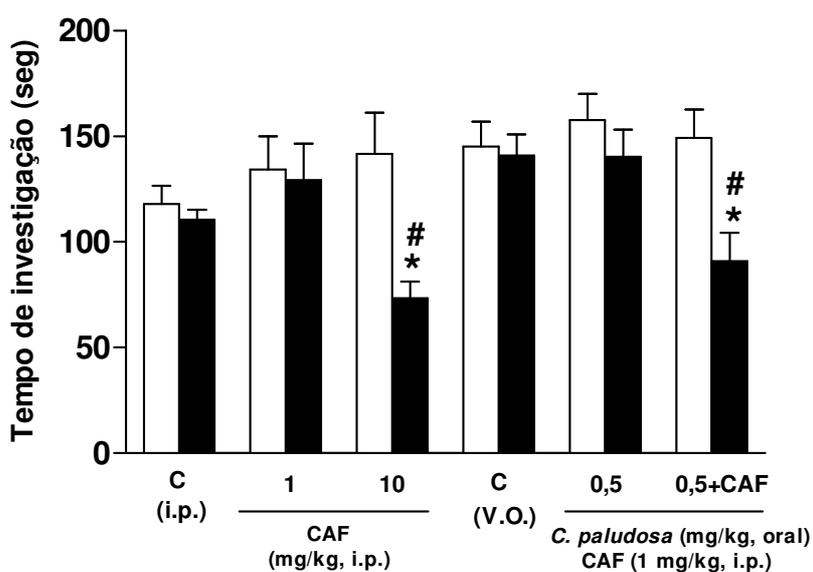


Gráfico 6: Efeito da administração aguda do EE da *C. paludosa* (0,5 mg/kg, v.o.), CAF (1 ou 10 mg/kg, i.p., controle positivo) ou da administração combinada do EE (0,5 mg/kg, v.o.) e CAF (1 mg/kg, i.p.) no tempo de investigação social de ratos adultos, quando um rato jovem não familiar foi re-exposto após um período de 120 min da primeira apresentação. Os resultados são expressos como a média \pm E.P.M. de 10 animais por grupo. As barras representam o tempo de investigação na primeira (barras brancas) e segunda (barras pretas) apresentação. * $p<0,05$ difere significativamente quando comparado à primeira apresentação do mesmo grupo. # $p<0,05$ difere significativamente quando comparado à segunda apresentação do grupo controle (Teste de Newman-Keuls). C=controle; CAF=caféina.

Para avaliar o possível envolvimento de receptores adenosinérgicos na facilitação da memória de reconhecimento do EE, em combinação com o EE, foram administradas doses “sub-efetivas” de antagonista não seletivo de receptor de adenosina, CAF (1 mg/kg, i.p., 30 min após a administração do EE) e EE (0,5 mg/kg, v.o.). Conforme demonstrado no gráfico 6, a administração combinada de CAF e EE diminuiu significativamente o tempo de investigação durante a segunda apresentação do mesmo rato jovem, uma vez que ele não teve esse efeito quando administrado sozinho.

Posteriormente, para investigar a interação do EE com antagonistas seletivos de receptores de adenosina na memória social, foi administrado em combinação, doses “sub-efetivas” de antagonistas de receptor A_1 1,3-dipropil-8-ciclopentilxantina (DPCPX 0,1 mg/kg, i.p.) e de receptor A_{2A} 4-(2-[7-amino-2-(2-furil)1,2,4-triazolo-[2,3-a][1,3,5]triazin-5-ilamino]etil)fenol (ZM241385 0,1 mg/kg, i.p.) com o EE (0,5 mg/kg, v.o.) (Gráfico 7).

O teste estatística ANOVA de uma via revelou um efeito significativo para o tratamento ($F_{(11,95)}=21,07$; $p<0,0001$) no tempo de investigação, durante a segunda apresentação do rato jovem. Como observado no gráfico 7, o teste de Newman-Keuls indicou que a administração combinada de DPCPX ou ZM241385 com o EE da *C. paludosa* diminuiu significativamente o tempo de investigação durante a segunda apresentação do mesmo rato jovem, enquanto que os antagonistas seletivos de receptores A_1 e A_{2A} não mostraram este efeito, quando administrados sozinhos.

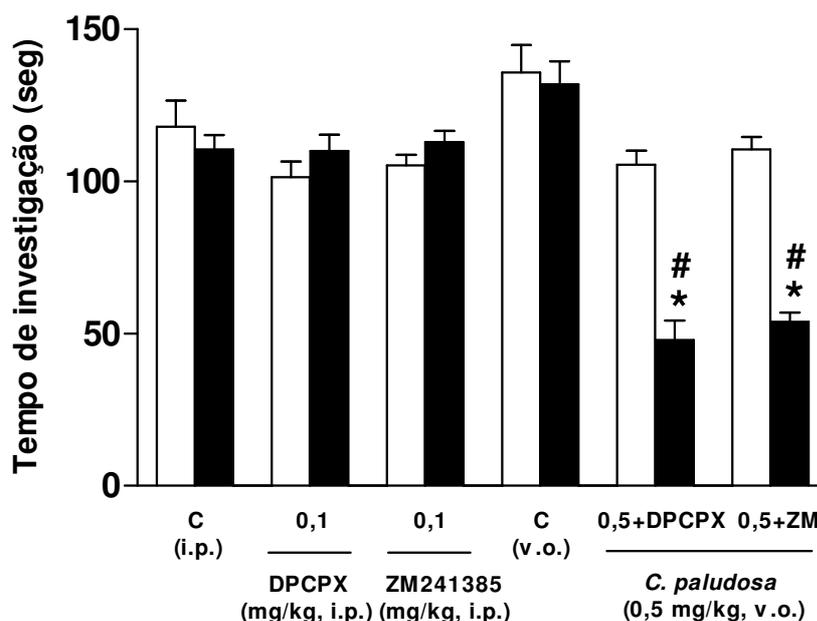


Gráfico 7: Efeito da administração aguda do EE da *C. paludosa* (0,5 mg/kg, v.o.), DPCPX (antagonista seletivo de receptor A_1 , 0,1 mg/kg, i.p.), ZM241385 (antagonista seletivo de receptor A_{2A} , 0,1 mg/kg i.p.) ou da administração combinada com o EE (0,5 mg/kg, v.o.) e DPCPX (0,1 mg/kg, i.p.) ou ZM241385 (0,1 mg/kg, i.p.) no tempo de investigação social de ratos adultos, quando um rato jovem familiar foi re-exposto, após um período de 120 min da primeira apresentação. Os resultados são expressos como a média \pm E.P.M. de 08 animais por grupo. As barras representam o tempo de investigação na primeira (barras brancas) e segunda (barras pretas) apresentação. * $p < 0,05$ difere significativamente quando comparado à primeira apresentação do mesmo grupo. # $p < 0,05$ difere significativamente quando comparado à segunda apresentação do grupo controle (Teste de Newman-Keuls). C=controle; ZM= ZM241385.

- Esquiva inibitória do tipo “step-down”

Os efeitos do tratamento agudo com o EE da *C. paludosa* (1, 10 ou 100 mg/kg, v.o.), CAF (1 ou 10 mg/kg, i.p., antagonista não seletivo de adenosina), DPCPX (antagonista de receptor A_1 , 0,1 mg/kg, i.p.), ZM241385 (antagonista de receptor A_{2A} , 0,1 mg/kg, i.p.) ou a administração combinada de DPCPX ou ZM241385, na MCD e MLD de ratos avaliados no teste a esquiva inibitória do tipo “step-down”, estão demonstrados no gráfico 8 A-C.

O teste não paramétrico de Kruskal-Wallis revelou um efeito significativo para o tratamento na latência dos animais na MCD ($H(3, N=8)=62,99$; $p < 0,0001$),

($H(5, N=12)=85,50; p<0,0001$) e ($H(5, N=12)=77,01; p<0,0001$) (Gráfico 8 A, B e C, respectivamente); e MLD ($H(3, N=8)=64,86; p<0,0001$), ($H(5, N=12)=85,87; p<0,0001$) e ($H(5, N=12)=69,57; p<0,0001$) (Gráfico 8 A, B e C, respectivamente). O teste de Dunn mostrou que o tratamento agudo com o EE da *C. paludosa* (100 mg/kg, oral), 60 min antes da sessão treino, aumentou significativamente a latência dos animais na MCD e MLD (Gráfico 8 A).

Esses resultados sugerem que o EE, na presente dose, facilita a retenção de memórias dos animais. O teste também revelou que a administração combinada de doses de CAF (1 mg/kg, i.p.) e EE da *C. paludosa* (1 mg/kg, v.o.) altera, significativamente, as latências dos animais durante as sessões testes avaliadas na MCD e na MLD (Gráfico 8 B). Além disso, para investigar a interação do EE da *C. paludosa* com antagonistas seletivos de adenosina, foi administrado a combinação de doses “sub-efetivas” de DPCPX (0,1 mg/kg, i.p.) e ZM241385 (0,1 mg/kg, i.p.) com o EE da *C. paludosa* (1 mg/kg, v.o.) (Gráfico 8 C). A administração combinada do EE (1 mg/kg, v.o.) com o ZM241385 (0,1 mg/kg, i.p.) aumentou de maneira significativa as latências dos animais avaliados na esquila inibitória durante as sessões da MCD e MLD (Gráfico 8 C).

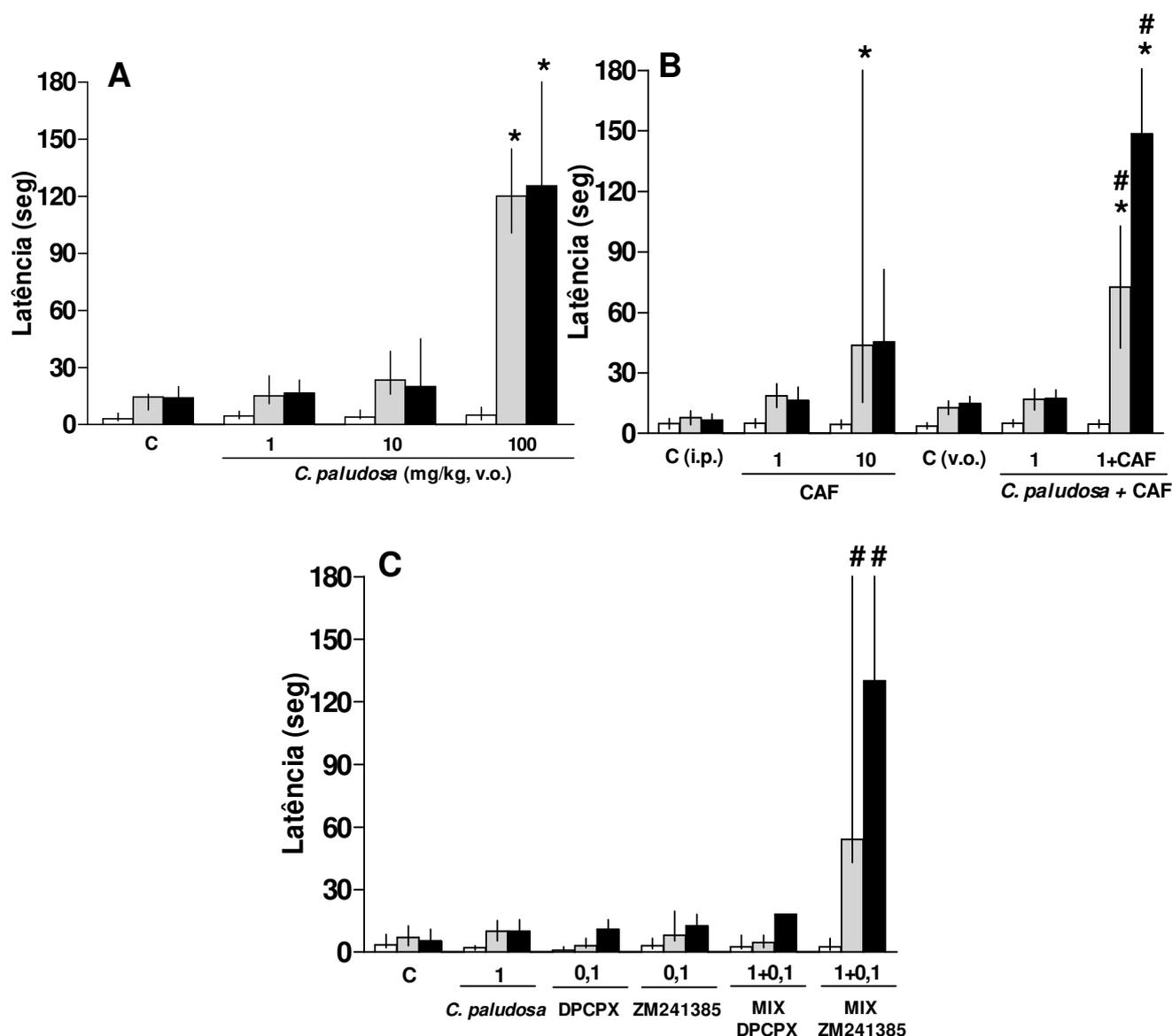


Gráfico 8: Efeito da administração aguda do EE da *C. paludosa* (1, 10 ou 100 mg/kg, v.o.), CAF (1 ou 10 mg/kg, i.p., antagonista não seletivo de adenosina), DPCPX (antagonista de receptor A₁ 0,1 mg/kg, i.p.), ZM241385 (antagonista de receptor A_{2A} 0,1 mg/kg, i.p.) ou da administração combinada (MIX) do EE (1 mg/kg, v.o.) e DPCPX (0,1 mg/kg, i.p.) ou ZM241385 (0,1 mg/kg, i.p.) na memória de ratos, avaliados no teste da esquiwa inibitória do tipo “ste-down”. (A) Efeito da administração do EE (1, 10 ou 100 mg/kg, v.o.) na retenção da memória de curta duração (MCD 1,5 h) e longa duração (MLD 24 h). (B) Efeito da administração do EE (1 mg/kg, v.o.), CAF (1 ou 10 mg/kg, i.p.) ou MIX de EE (1 mg/kg, v.o.) e CAF (1 mg/kg, i.p.) na retenção da MCD (1,5 h) e na MLD (24 h). (C) Efeito da administração do EE (1 mg/kg, v.o.), DPCPX (0,1 mg/kg, i.p.), ZM241385 (0,1 mg/kg, i.p.) ou MIX do EE (1 mg/kg, v.o.) e DPCPX (0,1 mg/kg, i.p.) ou ZM241385 (0,1 mg/kg, i.p.) na MCD (1,5 h) e MLD (24 h). Os dados estão expressos como as medianas (intervalo enterquartis) das latências de descida da plataforma nas sessões treino (barras brancas) e teste (1,5 h: barras cinzas; 24 h: barras rachuradas) (n=10 por grupo). * $p < 0,05$ difere significativamente quando comparado à respectiva sessão do grupo controle. # $p < 0,05$ difere significativamente quando comparado à respectiva sessão do grupo tratado (Teste de Dunn). C=controle, CAF=cafeína.

Com o intuito de verificar se o efeito do EE da *C. paludosa*, como facilitador da memória, poderia ter alguma relação com os dois compostos majoritários isolados da planta, eleuterina e a isoeleuterina, resolveu-se testá-los em camundongos, no teste da esQUIVA inibitória do tipo “*step-down*”.

Os efeitos do tratamento agudo com a eleuterina ou isoeleuterina (10, 50 ou 100 mg/kg, v.o.), CAF (1 mg/kg, i.p.), DPCPX (antagonista de receptor A₁, 0,1 mg/kg, i.p.), ZM241385 (antagonista de receptor A_{2A}, 0,1 mg/kg, i.p.) ou a administração combinada de DPCPX ou ZM241385 e dose seletiva dos compostos (10 mg/kg, v.o.) na MCD e na MLD dos animais, avaliados no teste da esQUIVA inibitória, estão demonstrados no gráfico 9 A-C.

O teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis revelou um efeito significativo para o tratamento nas latências da MCD e MLD gráfico 9 A ($H(6, N=21)=136,1$; $p<0,0001$), 9 B ($H(5, N=18)=128,9$; $p<0,0001$), e 9 C ($H(6, N=21)=112,0$; $p<0,0001$). O teste de Dunn mostrou que o tratamento com a eleuterina (50 ou 100 mg/kg, v.o.) ou isoeleuterina (100 mg/kg, v.o.), 60 min antes da sessão treino, aumentou significativamente as latências no teste de retenção das MCD e MLD. Esses resultados sugerem que os compostos da *C. paludosa*, nas doses selecionadas acima, melhoraram a retenção da MCD e MLD no teste da esQUIVA inibitória, em camundongos (Gráfico 9 A). Além disso, a administração combinada (MIX) de dose “sub-efetiva” de CAF (1 mg/kg, i.p.) e de eleuterina ou isoeleuterina (10 mg/kg, v.o.) alterou significativamente as latências dos animais durante as sessões teste (Gráfico 9 B).

A fim de se investigar a interação dos compostos da *C. paludosa* com antagonistas seletivos de receptores de adenosina, administrou-se combinação

de doses “sub-efetivas” de DPCPX (antagonista de receptor A_1 0,1 mg/kg, i.p.) e ZM241385 (antagonista de receptor A_{2A} 0,1 mg/kg, i.p.) com eleuterina ou isoeleuterina (10 mg/kg, v.o.) (Gráfico 9 C). Os MIXs com a eleuterina ou isoeleuterina+DPCPX ou ZM241385 aumentaram significativamente as latências dos animais durante as sessões de MCD e MLD, quando comparados aos seus respectivos controles (Gráfico 9 C).

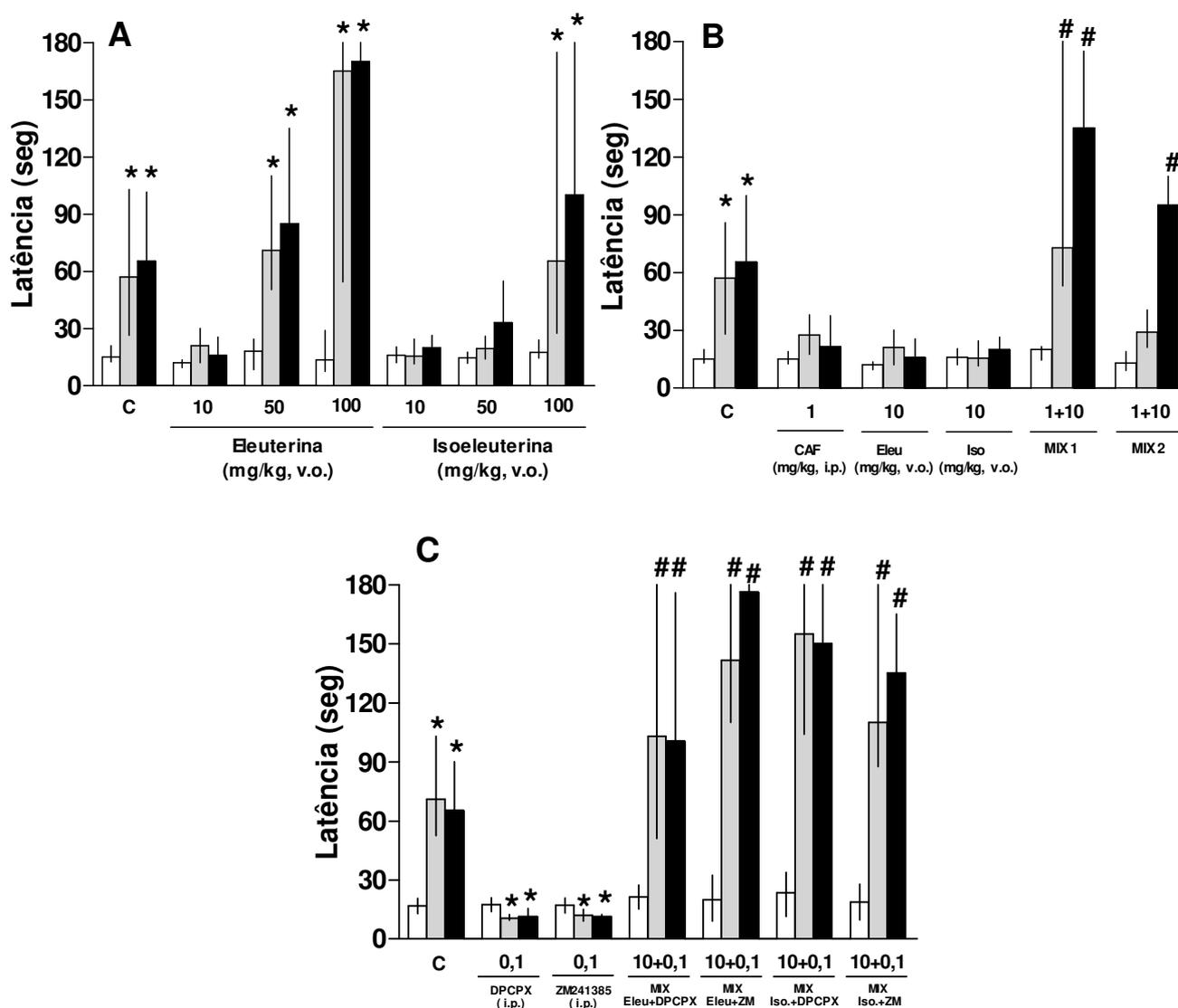


Gráfico 9: Efeito da administração aguda de eleuterina (1, 50 ou 100 mg/kg, v.o.), isoeleuterina (10, 50 ou 100 mg/kg, v.o.), CAF (1 mg/kg, i.p., controle positivo), DPCPX (antagonista de receptor A_1 0,1 mg/kg, i.p.), ZM241385 (antagonista de receptor A_{2A} 0,1 mg/kg, i.p.) ou da administração combinada (MIX) de dose seletiva de eleuterina ou isoeleuterina (10 mg/kg, v.o.) e DPCPX (0,1 mg/kg, i.p.) ou ZM241385 (0,1 mg/kg, i.p.), na memória de camundongos avaliados no teste da esquiwa inibitória do tipo “step-down”. (A) Efeito da administração de eleuterina (10, 50 ou 100 mg/kg) ou isoeleuterina (10, 50 ou 100 mg/kg) na retenção da memória de curta (MCD 1,5 h) e longa duração (MLD 24 h). (B) Efeito da administração da dose “sub-efetiva” de eleuterina ou isoeleuterina (10 mg/kg, v.o.), CAF (1 mg/kg, i.p.) ou MIX das mesmas com CAF (1 mg/kg, i.p.) na MCD (1,5 h) e MLD (24 h). (C) Efeito da administração de DPCPX (0,1 mg/kg, i.p.), ZM241385 (0,1 mg/kg, i.p.) ou MIX de eleuterina ou isoeleuterina (10 mg/kg, v.o.) e DPCPX (0,1 mg/kg, i.p.) ou ZM241385 (0,1 mg/kg, i.p.) na MCD (1,5 h) e MLD (24 h). Os dados estão expressos como as medianas (intervalo enterquartis) das latências de descida da plataforma nas sessões treino (barras brancas) e teste (1,5 h: barras cinzas; 24 h: barras rachuradas) ($n=6-8$ por grupo). * $p<0,05$ difere significativamente quando comparado à respectiva sessão do grupo controle. # $p<0,05$ difere significativamente quando comparado à respectiva sessão do mesmo grupo (Teste de Dunn). C=controle, CAF=caféina, Eleu=eleuterina, Iso=isoeleuterina, MIX1=eleuterina+CAF, MIX2=isoeleuterina+CAF.

4. DISCUSSÃO

Os resultados obtidos no presente estudo demonstraram que o tratamento agudo com o EE dos bulbos da *C. paludosa* (Iridaceae) nas doses de 1, 10 ou 100 mg/kg, por v.o., não apresentou qualquer efeito do tipo ansiolítico ou antidepressivo em animais, quando avaliados no teste do LCE e nado forçado, respectivamente. Entretanto, o EE da *C. paludosa* na dose de 100 mg/kg, e suas duas naftoquinonas (eleuterina e isoeleuterina), nas doses de 50 e/ou 100 mg/kg foram capazes de facilitar ou melhorar processos cognitivos relacionados às memórias do tipo operacional e espacial, quando avaliadas nos testes de memória social e esquiva inibitória do tipo “*step-down*”, respectivamente.

Para descartar qualquer efeito inespecífico do EE, que pudesse interferir nos resultados, foi realizado o teste do campo aberto, onde se pode observar que nenhuma alteração significativa foi encontrada em todas as doses avaliadas. Observou-se que os efeitos facilitadores da memória foram mediados pelos antagonistas seletivos de receptores de adenosina, onde se observou uma resposta sinérgica seguida da administração combinada de doses “sub-efetivas” do EE da *C. paludosa*, CAF (antagonista não seletivo de receptor de adenosina) e as naftoquinonas da *C. paludosa*.

Além disso, o presente estudo demonstra o envolvimento de receptores de adenosina A_1 e A_{2A} nessas respostas, onde a administração aguda de doses seletivas do EE da *C. paludosa* (1 mg/kg, v.o.), eleuterina ou isoeleuterina (10 mg/kg, v.o.), melhoraram os processos cognitivos prejudicados pelos antagonistas de A_1 (DPCPX 0,1 mg/kg, i.p.) e A_{2A} (ZM241385 0,1 mg/kg, i.p.) quando avaliados no teste da esquiva inibitória do tipo “*step-down*”. Os presentes dados também

demonstram que o pré-tratamento de camundongos com o EE da *C. paludosa* (0,5 mg/kg, v.o.), eleuterina ou isoeleuterina (10 mg/kg, v.o.) e, posteriormente, tratados intraperitonealmente com uma única dose “sub-efetiva” de antagonista de A_1 (DPCPX 0,1 mg/kg) e de A_{2A} (ZM241385 0,1 mg/kg), mostraram um efeito facilitador ou melhorador da memória nos testes avaliados, por apresentarem um aumento na latência dos animais tratados, quando comparados aos seus respectivos grupos controles.

O sistema adenosinérgico é bem conhecido por ser uma via fundamental para os processos de aprendizagem e memória (Cunha, 2001; Sebastião e Ribeiro, 2000), sendo uma via importante na regulação da transmissão sináptica e excitabilidade neuronal, incluindo o envolvimento de mecanismos como a potenciação hipocampal de longa duração (LTP) (de Mendonça e Ribeiro, 1994) e depressão de longa duração (LTD) (de Mendonça e cols., 1997), que são considerados mecanismos básicos envolvidos nos processos mnemônicos.

O sistema adenosinérgico é mediado pela ativação de receptores de alta afinidade (A_1 e A_{2A}), os quais são de importância fisiológica; e os de baixa afinidade como os A_{2B} , os quais estão relacionados às condições patológicas (Prediger e Takahashi, 2005). Eles pertencem à família de receptores acoplados à proteína G, e todos têm sido clonados e caracterizados em várias espécies de mamíferos, incluindo o homem e o rato (Fredholm e cols., 2001). Dentre os receptores de adenosina, os receptores A_1 é encontrado em densidade no SNC, com alta expressão no córtex cerebral, hipocampo, cerebelo, tálamo, tronco cerebral e medula espinhal (Fredholm e cols., 2001). Os receptores A_{2A} possuem

uma distribuição mais restrita ao SNC, ocorrendo basicamente no estriado, núcleo accumbens e tubérculo olfatório (Ongini e Fredholm, 1996).

Tem sido amplamente reconhecido, que muitas plantas medicinais podem melhorar a memória e funções cognitivas relacionadas às doenças neurodegenerativas (Chonpathompikunlert *e cols.*, 2010; Ho *e cols.*, 2009; Prediger *e cols.*, 2008), entre elas plantas pertencentes a família Iridaceae (Pitisikas e Sakellaridis, 2006; Pitisikas *e cols.*, 2007; Sugiura *e cols.*, 1994, 1995; Zhang *e cols.*, 1994). Sendo assim, a *C. paludosa* pode ser uma alternativa para o tratamento desse tipo de disfunção.

Recentemente, dados adicionais do nosso grupo de pesquisa, demonstraram os efeitos facilitatórios dos bulbos do EE da *C. paludosa* na memória de ratos, sendo esses efeitos podem ser modulados pelos sistemas colinérgico, glutamatérgico e nitrérgico (dados ainda não publicados).

Os estudos fitoquímicos de outros compostos presentes na planta estão em processo de identificação. Estes, provavelmente, poderão ser responsáveis, pelo menos em parte, por estas propriedades neuroprotetoras, aqui investigadas.

Kandell *e cols.* (2000) e Bear *e cols.* (2002) definem a memória como sendo a capacidade que tem o homem e os animais de reter, recuperar, armazenar e evocar informações disponíveis no SNC. Desta forma, podemos dizer que é a retenção da informação aprendida. Há várias estruturas cerebrais relacionadas à memória, e não há um alvo único envolvido na aquisição, armazenamento e evocação das diversas informações adquiridas por aprendizagem, tais como: hipocampo, amígdala, córtex entorrinal, giro

parahipocampal, fórnix, corpos mamilares, giro do cíngulo, entre outros (Bear e cols., 2002; Kandell e cols., 2000).

De acordo com Izquierdo e cols. (1999), as memórias podem ser classificadas, de acordo com o seu tempo de duração, em memória operacional ou de trabalho (memória imediata que dura segundos ou poucos minutos), memória de curta duração (que se desenvolve em alguns segundos ou minutos e dura várias horas) e memória de longa duração (que consolida lentamente e é relativamente estável). Estas memórias são identificadas como mecanismos separados (Emptage e Carew, 1993; Izquierdo e cols., 1999). Esses tipos distintos de memórias podem ser avaliados em estudos animais, usando diferentes testes comportamentais.

A memória social (ou paradigma de reconhecimento) é considerada um bom modelo animal dessa forma de memória em seres humanos que é principalmente gerada, a partir de estímulos olfativos. Esse modelo de memória é baseado no fato de que roedores gastam muito mais tempo investigando intensamente um rato jovem não familiar do que um familiar (Dantzer e cols., 1987). A memória social é prolongada por exposição repetida aos estímulos do rato jovem e prejudicada pela interferência retroativa do estímulo. Isso pode ser facilitado por fármacos que melhoram a memória e interrompido por modelos farmacológicos e patofisiológicos, conhecidos por prejudicar a memória em roedores (Prediger e cols., 2005a; Prediger e Takahashi, 2003, 2005).

O presente estudo demonstrou que um único tratamento oral com o EE da *C. paludosa* (1, 10 ou 100 mg/kg) diminuiu o tempo de investigação do mesmo rato jovem no processo de esquecimento (120 min após a primeira exposição),

respondendo similarmente com o grupo tratado com CAF, indicando que o EE da *C. paludosa* melhora a memória social de curto prazo em ratos. Essa resposta não pode ser atribuída aos efeitos não-específicos do EE, uma vez que não houve redução no tempo de investigação, observado quando um rato jovem diferente foi utilizado para a segunda apresentação ao rato adulto.

É importante notar que a facilitação da memória de reconhecimento social de ratos adultos, induzida pelo EE da *C. paludosa*, não pode ser exclusivamente explicada pela melhora no desempenho da discriminação olfatória de ratos, uma vez que a administração do EE não alterou o tempo de investigação/exploração durante a primeira apresentação do rato jovem nos experimentos de reconhecimento social. Além disso, essas respostas foram mediadas pelo envolvimento de receptores adenosinérgicos A_1 e A_{2A} , melhorando a memória social.

Reforçando os resultados obtidos no teste de reconhecimento social, uma única administração de uma dose “sub-efetiva” do EE da *C. paludosa* (1 mg/kg, v.o.) administrada 1 h antes da sessão treino, e CAF (1 mg/kg, i.p.) 30 min após a administração do EE, aumentou significativamente a latência dos animais durante a sessão teste da retenção da MCD (1,5 h) e MLD (24 h), depois da sessão treino no teste da esquiiva inibitória do tipo “*step-down*”. Esses dados indicam o efeito facilitador do EE da *C. paludosa* na memória espacial e a interação com o sistema adenosinérgico. Além disso, essas respostas podem ser mediadas pelo envolvimento com antagonista de receptor A_{2A} de adenosina no aumento da retenção da memória.

O teste da esquiva inibitória é um paradigma clássico para avaliar memória com um forte componente aversivo (Cahill e cols., 1986). Um efeito ansiogênico poderia explicar o aumento da latência. Esses dados estão de acordo com a literatura e confirmam estudos prévios de nosso laboratório (Lucena e cols., 2010a), onde foi demonstrado que as mesmas doses do EE da *C. paludosa* (1, 10 ou 100 mg/kg) utilizadas no presente trabalho, não apresentaram qualquer efeito ansiogênico e também não afetaram a atividade locomotora dos animais.

Além disso, para verificar se o efeito do EE da *C. paludosa* em facilitar a memória dos animais poderia ser devido às naftoquinonas presentes nos bulbos, avaliou-se o possível efeito facilitador dos compostos eleuterina e isoeleuterina no teste da esquiva inibitória em camundongos. Os dados demonstraram que a eleuterina (50 ou 100 mg/kg, v.o.) e a isoeleuterina (100 mg/kg, v.o.) aumentaram a latência dos animais durante a retenção da MCD e MLD, indicando uma melhora da memória quando comparadas ao grupo controle. Além disso, essas respostas foram reforçadas pelo envolvimento de antagonistas de receptores de adenosina (A_1 e A_{2A}) com uma dose “sub-efetiva” dos compostos (10 mg/kg, v.o.).

5. CONCLUSÕES PARCIAIS

Os resultados mostraram que o EE da *C. paludosa* e suas naftoquinonas estudadas melhoraram os processos cognitivos avaliados no teste de reconhecimento social e esquiva inibitória. Esses efeitos podem ser modulados pela ação de receptores de adenosina A_1 e A_{2A} . Entretanto, faz-se necessário estudos adicionais a fim de determinar o mecanismo molecular preciso e os sítios anatômicos envolvidos nesses efeitos facilitatórios da memória. Em conjunto, esses dados sugerem o uso dessa planta na proteção contra doenças cognitivas.

CAPÍTULO 2

Cipura paludosa x EtOH x Estresse oxidativo

EFEITOS DA *C. paludosa* EM RATOS ADULTOS EXPOSTOS AO EtOH DURANTE O PERÍODO GESTACIONAL E LACTACIONAL

1. INTRODUÇÃO

1.1. Qual o interesse em se estudar o EtOH?

❖ A intoxicação pelo EtOH

A dependência ao álcool, conhecida como alcoolismo, é um distúrbio crônico cuja origem pode ser genética. É caracterizada pela tolerância aos efeitos do álcool, controle motor prejudicado, síndrome de abstinência quando há parada ou redução no consumo alcoólico, uso continuado devido às consequências adversas e dificuldade em controlar o consumo em decorrência do grande desejo ou compulsão por aquela droga (Knopik *e cols.*, 2009; Schuckit, 2009; Tobamidanik e Zabkiewicz, 2009).

As consequências da exposição ao EtOH no período da pré-organogênese são negligenciadas, algumas vezes, devido ao fato de culminar em aborto espontâneo ou reabsorção do embrião. Tal fato, porém, deve ser considerado como o mais extremo efeito adverso da exposição gestacional àquela droga, porque culmina com a morte embrionária e finalização da gravidez (Becker *e cols.*, 1996; Burd e Wilson, 2004). Quando esses aspectos não ocorrem, retardos do crescimento, anormalidades estruturais cerebrais e alterações comportamentais podem se fazer presentes (Coles *e cols.*, 2009; Herman *e cols.*, 2008; Jirikowic *e cols.*, 2008; Nayak e Murthy, 2008).

Em relação ao consumo abusivo de álcool e suas associações, principalmente na gravidez, vários fatores se destacam, entre eles os efeitos no

organismo do embrião em crescimento e alterações comportamentais após o nascimento, caracterizando a Síndrome Alcoólica-Fetal (FAS). Esta causa sérios problemas ao recém-nascido e ao longo de seu desenvolvimento, além de aumentar o estresse oxidativo sistêmico fetal (Gauthier *e cols.*, 2005; Leutwyler *e cols.*, 2004; Wilmott, 2004). A mulher que consome frequentemente esta droga, não muda seus hábitos durante a gravidez (Centers for Disease Control and Prevention, 2004).

As características mais debilitantes decorrentes da FAS são: mortalidade ainda na vida intra-uterina ou graves problemas de desenvolvimento, anormalidades faciais, pequenas fissuras palpebrais, microencefalia, ausência do núcleo caloso e alterações comportamentais, tais como hiperatividade, disfunção motora, déficit de atenção, aprendizagem e memória (Coles *e cols.*, 2009; Herman *e cols.*, 2008; Jirikowic *e cols.*, 2008; Nayak e Murthy, 2008).

Mesmo crianças que não apresentaram FAS, mas que foram expostas ao álcool no período pré-natal, mostraram déficits de memória e aprendizado verbal (Neese *e cols.*, 2004; Willford *e cols.*, 2004) e uma predisposição às doenças psíquicas (ansiedade e/ou depressão) (Streissguth *e cols.*, 1997; O'Connor *e cols.*, 2002; Barr *e cols.*, 2006). Em conjunto, todos esses fatores formam um conhecido e sério problema no tratamento do alcoolismo.

❖ EtOH x metabolismo e envolvimento no estresse oxidativo

O EtOH é solúvel em água e em muitos solventes orgânicos e pode cruzar as membranas celulares facilmente, incluindo a barreira hematoencefálica. Em

animais, a maior parte dele é metabolizado no fígado por álcool desidrogenases, para formar acetaldeído (aldeído etanal):



Etanal é mais tóxico que o EtOH e deve ser rapidamente metabolizado pela aldeído desidrogenase na mitocôndria, produzindo o ácido acético (ácido etanóico).



Pequenas quantidades de EtOH podem ser oxidadas por uma ação peroxidática da catalase nos peroxissomos e por certos citocromos P450. A atividade de oxidação desse neurotóxico, ligada aos citocromos P450, é chamada sistema microsomal de oxidação do EtOH (MEOS). A exposição contínua ao EtOH induz a síntese de CYP2E1, um tipo de citocromo P450. Este citocromo não só oxida EtOH à acetaldeído, mas à muitos outros substratos, incluindo acetona, butanol, pentanol, anilina, paracetamol, benzeno, pentano, isoflurano e clorofórmio.

Vários xenobióticos (compostos químicos estranhos a um organismo ou sistema biológico) são metabolizados pelo P450 a produtos mais reativos. Assim, em consumidores de álcool, como o CYP2E1 está aumentado, os xenobióticos podem ser tóxicos em concentrações mais baixas do que o comum em pessoas que não consomem álcool (Halliwell e Guteridge, 1999).

O sistema MEOS tem uma alta constante de Michaelis (K_m) para o EtOH (8-10 mM) comparado com 0,2-2 mM para a álcool desidrogenase. Entretanto, durante sua ação, o CYP2E1 libera intermediários reativos, entre eles o radical

superóxido ($O_2^{\bullet-}$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radicais livres hidroxietil (Limuro *e cols.*, 1996). Esses últimos radicais podem formar adutos (moléculas intermediárias) com proteínas. Assim, CYP2E1 tem sido descrito como uma fonte de estresse oxidativo em dependentes em álcool.

O CYP2E1 está presente em várias regiões do cérebro e é induzido pela exposição ao EtOH sendo, talvez, uma rota importante do metabolismo do álcool porque o cérebro possui baixos níveis de atividade da álcool desidrogenase (Montoliu *e cols.*, 1995). O acetaldeído formado na oxidação do EtOH pode gerar estresse oxidativo ao sofrer reações reversíveis com a glutatona (diminuindo, assim, as concentrações de glutatona) e também com os grupos sulfidrilas ($-SH$) e aminas (NH_2) de proteínas (Halliwell e Gutteridge, 1999). Além disso, o acetaldeído, EROs, radical 1-hidroxietil, e os produtos da peroxidação de lipídios podem todos causar danos no DNA mitocondrial (Mansouri *e cols.*, 2001).

Dessa forma, as mitocôndrias são os principais alvos da toxicidade do EtOH no fígado, cérebro, coração, músculos esqueléticos e pâncreas. Especificamente no fígado, a intoxicação aguda e crônica por essa droga causa danos oxidativos às proteínas mitocondriais, aos fosfolipídios, e ao DNA mitocondrial (DNAmt) (Cahill *e cols.*, 1999; Cederbaum, 1999). Porém, os danos oxidativos ao DNAmt não são exclusivos das alterações hepáticas, de tal modo que o estresse oxidativo devido ao metabolismo, causa também a degradação e danos oxidativos no DNAmt no cérebro, coração, e músculo esquelético em ratos, semelhantes aos observados no tecido hepático, e podem ser inibidos também por diversos antioxidantes, como a vitamina E (Mansouri *e cols.*, 2001).

Em síntese, um dos mecanismos de toxicidade do EtOH está associado à geração EROs e radicais livres que são gerados durante o seu metabolismo, causando a peroxidação de lipídios por estresse oxidativo no fígado, cérebro e em outros tecidos.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Animais e Tratamento

Ratos Wistar, machos (n=40) e fêmeas (n=40), 3 meses, provenientes do Biotério da FM/FS da UnB, foram mantidos em condições padronizadas de temperatura, exatidão, ciclo de luz claro/escuro de 12 horas, água e comida *ad libitum*. Nas salas onde ocorreram os experimentos comportamentais foram utilizadas lâmpadas fluorescentes para iluminação. Ratos foram colocados em casais para copularem no período da manhã, em caixas isoladas sem serragem, protegidas internamente por uma grade, para protegê-los do contato das fezes/urina e facilitar a localização dos tampões vaginais, liberados pelas fêmeas após a cópula.

No dia seguinte, tão logo detectada a presença dos referidos tampões nas caixas, as fêmeas foram consideradas como prováveis grávidas e separadas, individualmente, em caixas devidamente identificadas, conforme os tipos de tratamento, todos feitos por gavagem. Elas receberam água de torneira ou EtOH 22,5 p/v (6,5 g/kg) por dia, durante o período gestacional (21 dias) e lactacional (21 dias). Estes períodos são críticos estágios de desenvolvimento em que a zona ventricular cerebral do feto produz neurônios no córtex cerebral embrionário (DiCicco-Bloom e Sondell, 2005). As soluções foram administradas em volumes

de 1 mL/kg de peso corpóreo total. A dose para o tratamento com EtOH foi baseada na literatura e em resultados pilotos realizados em nosso laboratório (Maier e West, 2001; Maia *e cols.*, 2009).

Após o nascimento, as proles foram mantidas com a mãe até o 21^o dia (desmame), sendo estas separadas por sexo e grupo experimental controle (C) e EtOH. Ao atingirem dois meses de idade, as proles foram separadas em subgrupos de animais para receberem tratamento crônico, por gavagem, por 14 dias que antecederam os testes comportamentais. O tratamento com o EE da *C. paludosa* ou veículo (salina) foi realizado nas proles machos e nas doses de 1, 10 ou 100 mg/kg, com n=10 animais por grupo. As proles fêmeas foram utilizadas em outros projetos. O interesse em se investigar estas três doses do EE da *C. paludosa* foi baseado em resultados anteriores do nosso grupo, onde a dose de 10 mg/kg mostrou uma satisfatória atividade antinociceptiva de origem central (Lucena *e cols.*, 2007a) e a dose de 100 mg/kg apresentou ação neuroprotetora contra as neurodegenerações produzidas pelo MeHg (Lucena *e cols.*, 2007b).

2.2. Testes comportamentais

As metodologias empregadas nos testes comportamentais foram descritas previamente no primeiro capítulo (páginas 17 a 26).

2.3. Testes bioquímicos

2.3.1. Preparação dos tecidos

Após os testes comportamentais, os animais foram sacrificados por decapitação (fazendo-se uso de guilhotina) e algumas áreas do SNC (córtex,

hipocampo e cerebelo) responsáveis por funções motoras, psíquicas e/ou cognitivas foram rapidamente removidos. O fígado, que é o principal órgão responsável pela metabolização do álcool, também foi alvo de estudo. Neste processo, os tecidos foram rapidamente lavados com solução tamponada com fosfato (PBS: Phosphate Buffered Saline) e congelados em freezer -80°C no Laboratório de Estresse Oxidativo da Biologia Molecular, do IB da UnB.

2.3.2. Determinação das atividades enzimáticas

- Preparo dos extratos proteicos

As amostras de tecido congeladas foram transferidas para um almofariz resfriado em nitrogênio líquido, pulverizadas, e seu pó colocado em um tubo eppendorf (também resfriado em nitrogênio líquido) para pesagem. Em seguida, o pó foi transferido para um homogeneizador de 2 mL (tubo e pistilo de vidro), mantido no gelo. A homegeneização foi realizada com tampão fosfato 0,5 M, pH 7,2, contendo 5 mM de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) e inibidor de proteases. A concentração final do homogenato foi de tampão fosfato 50 mM, pH 7,2, EDTA 0,5 mM. O homogenato foi transferido para tubo eppendorff, previamente mantido no gelo, e centrifugado por 20 min a 12.000xg sob baixa temperatura (4°C), e seu sobrenadante foi usado para a determinação das atividades enzimáticas.

- Catalase

Esta enzima catalisa a decomposição de H₂O₂ em H₂O e O₂.



A atividade enzimática da catalase foi determinada espectrofotometricamente, acompanhando a degradação de H_2O_2 a 240 nm, como descrito por Aebi (1984). Uma unidade (U) de catalase foi definida como a quantidade de enzima que degrada 1 μmol de substrato (H_2O_2) por minuto. O volume final foi de 1 mL, e as concentrações do meio reacional foram: tampão fosfato 50 mM, pH 7,2, EDTA 0,5 mM, e H_2O_2 10 mM. Em uma cubeta de quartzo, a reação foi disparada com 100 μL de solução de H_2O_2 100 mM e a degradação do H_2O_2 a 240 nm foi acompanhada por 120 min. As amostras correspondendo aos brancos foram preparadas na ausência de H_2O_2 . A atividade enzimática foi calculada usando-se o coeficiente de extinção molar ($\epsilon_{240} = 0,00394 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) (Aebi, 1984). Para medir a atividade da catalase nos tecidos cerebrais foram usados 30 a 100 μL de sobrenadante de homogenato, e no fígado 2 μL de sobrenadante na diluição 1:10.

- **Glutathione peroxidase dependente de selênio**

A atividade de Se-GPx foi determinada por meio da oxidação de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida (NADPH), estimada por meio da variação da absorbância (A) em 340 nm pelo método descrito por Paglia e Valentine (1967) e, previamente modificado, por Hermes-Lima e Storey (1995). Uma unidade (U) de Se-GPx equivale à quantidade de enzima que promove a oxidação de 1 μmol de NADPH por minuto ($\epsilon_{340} = 6,22 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). O volume final foi de 1 mL, e as concentrações do meio reacional foram: tampão fosfato 50 mM, pH 7,2, EDTA 0,5 mM; azida sódica (NaN_3) 4 mM, glutathione reduzida (GSH) 5 mM; GR 0,1 U/mL; NADPH 0,2 mM e H_2O_2 0,1 mM.

Neste método, a GPx degrada H_2O_2 usando a GSH como coenzima, que é transformada em GSSG. Esta é convertida novamente em GSH pela ação da GR, que consome NADPH. A NaN_3 é responsável por inibir a catalase.



A Se-GPx se diferencia das demais peroxidases não somente pela presença de selênio (Flohé e cols., 1973), mas também por degradar especificamente H_2O_2 (Burk e cols., 1978).

Em uma cubeta, os reagentes foram misturados na sequência: tampão fosfato, EDTA, NaN_3 , GSH, GR e sobrenadante de homogenato e incubados por, aproximadamente, 3 min sob temperatura ambiente, até que a oxidação de NADPH estivesse estável (Awasthi e cols., 1975; Flohé e Günzler, 1984; Wendel, 1981). A reação foi disparada com 50 μL de solução de H_2O_2 2 mM e a oxidação do NADPH a 340 nm foi acompanhada por 180 min. As amostras correspondendo aos brancos foram preparadas na ausência de sobrenadante das amostras.

Semelhante à catalase, não é possível saturar a atividade da GPx como substrato, responsável pela degradação da enzima, e sua atividade varia com pequenas variações da concentração de H_2O_2 (Flohé e Günzler, 1984). Para medir a atividade da Se-GPx nos tecidos cerebrais foram usados 10 a 20 μL de sobrenadante de homogenato, e no fígado 10 μL de sobrenadante na diluição 1:100.

2.3.3. Concentração de proteína

A concentração de proteínas solúveis totais foi determinada pela reação entre as proteínas contidas nas amostras com o reagente de “Coomassie Brilliant Blue G-250”, usando o método de Bradford (1976) e solução de albumina de soro bovino (BSA) como padrão.

Para a quantificação de proteínas pelo método de Bradford (1976), foram utilizadas alíquotas de sobrenadantes de homogenatos, utilizados nos ensaios enzimáticos descritos anteriormente. No dia do ensaio, o sobrenadante de homogenato das amostras foi descongelado e misturado em tubos de ensaio com 1 mL de Coomassie Brilliant Blue G-250 e BSA (1mg/mL). A absorbância em 595 nm foi registrada após dois minutos de incubação. Uma curva padrão foi feita para se determinar o volume em μL de sobrenadante de homogenato das amostras, bem como o volume em μL de BSA a serem utilizados nos ensaios. Para medir a concentração de proteínas nos tecidos cerebrais foram usados 10 a 20 μL de sobrenadante de homogenato, e no fígado 5 μL de sobrenadante na diluição 1:10.

2.3.4. Indicadores de danos oxidativos

- Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

O teste de TBARS é usado há muitos anos como um indicador de peroxidação lipídica (Bernheim e cols., 1948; Uchiyama e Mihara, 1978; Esterbauer e Cheeseman, 1990). A peroxidação lipídica resulta na formação de aldeídos, como o malondialdeído (MDA), que reage com duas moléculas de ácido tiobarbitúrico (TBA), formando um aduto $\text{TBA}_2\text{-MDA}$.

A peroxidação lipídica foi medida pelo método previamente descrito por Uchiyama e Mihara, 1978 e modificado por Hermes-Lima e Storey, 1995. As amostras de tecido congeladas foram transferidas para um almofariz resfriado em nitrogênio líquido, pulverizadas, e seu pó foi colocado em um tubo eppendorf (também resfriado em nitrogênio líquido) para pesagem. Em seguida, o pó foi transferido para um homogeneizador de 2 mL (tubo e pistilo de vidro), mantido no gelo, numa diluição de 1:10. A homogeneização foi realizada com ácido fosfórico (H_3PO_4) 0,2 e 1%.

Posteriormente, foram separados dois tubos de ensaio, mantidos no gelo, um para o branco e o outro para o teste. No tubo branco, foram pipetados 400 μL do homogenato ácido, 400 μL de ácido clorídrico (HCl) 3 mM e 200 μL de H_3PO_4 7%. No tubo teste, foram pipetados 400 μL do homogenato ácido, 400 μL de TBA 1% contendo hidroxitolueno butilado (BHT) 10 mM para prevenir uma possível peroxidação durante a homogeneização, e 200 μL de H_3PO_4 7%. Os tubos foram agitados no vórtex por 10 segundos e aquecidos em banho acima de 90°C por 15 min e, posteriormente, acrescentado 1,5 mL de butanol.

Em uma etapa posterior, os tubos foram centrifugados por 5 min a 10.000xg sob baixa temperatura (4°C). A fase orgânica foi removida e colocada em cubeta de vidro e as absorbâncias em 532 e 600 nm foram registradas. Para o cálculo, a absorbância (A) A_{532} foi subtraída da A_{600} , para evitar diferenças advindas de absorção de fundo, onde o valor da absorbância final da amostra foi subtraído do valor final da absorbância do branco. O valor de TBARS foi quantificado usando o coeficiente de extinção molar de 156 $\text{mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ (Wills, 1969).

Embora a quantificação espectrofotométrica do TBARS não possa ser considerada uma única técnica para determinar MDA em tecidos, porque o ensaio superestima os níveis reais de MDA, é considerada efetiva para estudos comparativos de estresse oxidativo, uma vez que vários outros aldeídos que reagem com TBA também são produtos da peroxidação lipídica (Lapanna e Cuccurullo, 1993).

- **Peroxidação lipídica pelo método de alaranjado de xilenol**

O nível de peroxidação lipídica também foi medido por meio do método de alaranjado de xilenol, descrito por Hermes-Lima *et al.*, 1995. Peróxidos oxidam Fe_2^+ sob baixo pH, e o Fe_3^+ forma um complexo com alaranjado de xilenol, que absorve luz em 580 nm. As amostras de tecidos congeladas, pulverizadas e pesadas foram homogeneizadas em homogeneizador de vidro de 2 mL (tubo e pistilo de vidro), mantido no gelo. Utilizou-se metanol gelado para extrair os lipídios, usando-se uma diluição de 1:5 p/v. O homogenato foi centrifugado a 10.000xg por 5 min sob baixa temperatura (4°C).

Os reagentes nas concentrações finais foram adicionados em tubos eppendorf: FeSO_4 0,25 mM, H_2SO_4 25 mM, alaranjado de xilenol 0,1 mM. Ao final foram adicionados 75 μL de sobrenadante metanólico de homogenatos e o volume final para 1 mL foi ajustado com água deionizada. Os tubos foram agitados em vortex e mantidos em temperatura ambiente por 24 h, quando a reação estava completa. O branco foi feito sem a adição de homogenato. Posteriormente, a absorbância em 580 nm foi registrada e aos tubos foram adicionados 5 μL de hidroperóxido de cumeno (CHP) 0,5 mM, que foram

novamente agitados em vortex. Após uma hora, a A_{580} foi novamente registrada. Os níveis de hidroperóxidos de lipídios foram expressos como equivalentes de cumeno hidroperóxido (Hermes-Lima *et cols.*, 1995).

2.4. Análise estatística

Os dados foram expressos como a média + erro padrão da média (E.P.M.) de 10 animais por grupo (para os testes comportamentais) e de 3 animais por grupo (para os testes bioquímicos). As comparações estatísticas dos resultados foram realizadas por análise de variância (ANOVA) de uma via e os grupos foram comparados entre si, pelo teste *post-hoc* de Newman-Keuls. A probabilidade aceita como indicativa da existência de diferença estatisticamente significativa foi de $p < 0,05$. Os dados foram analisados utilizando-se o software GraphPad Prism 4® (San Diego, CA).

Para a análise dos dados do tempo de latência no teste de esquiiva inibitória do tipo *step-down* foi realizada uma análise não paramétrica, onde foram demonstradas as medianas (intervalo interquartis) de 10 animais por grupo, das latências de descida da plataforma e analisados através do teste Kruskal-Wallis seguido do teste *post hoc* de Dunn ou Mann-Whitney, quando apropriados.

3. RESULTADOS

3.1. Teste da Atividade locomotora espontânea

Os efeitos do tratamento crônico da administração oral do EE da *C. paludosa* (1, 10 ou 100 mg/kg), veículo (10 mL/kg), DZP (1 mg/kg, controle positivo para o teste do LCE), FXT (10 mg/kg, controle positivo para o teste do nado forçado) ou CAF (10 mg/kg, controle positivo para os testes de memória) em

proles adultas de ratas expostas ao EtOH durante o período gestacional e lactacional avaliadas no teste do campo aberto estão presentes no gráfico 10. A ANOVA de uma via não revelou qualquer diferença significativa entre os grupos, quando comparados ao controle ($F_{(10,109)} = 1,214$, $p=0,2917$).

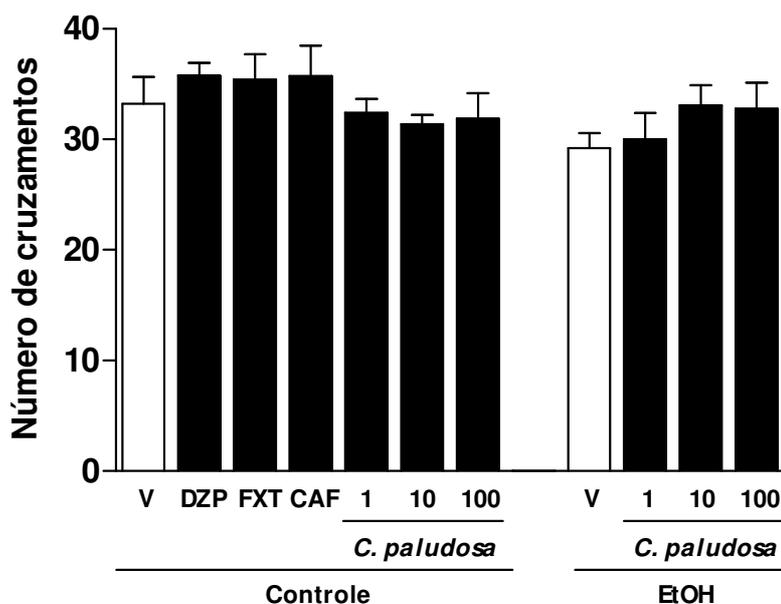


Gráfico 10: Efeito da administração crônica do EE da *C. paludosa* (1, 10 ou 100 mg/kg, v.o.) ou veículo (V) na atividade locomotora de proles adultas de ratas expostas ao EtOH durante o período gestacional e lactacional, avaliadas no teste do campo aberto durante 5 min. DZP (1 mg/Kg), FXT (10 mg/Kg) ou CAF (10 mg/kg) foram utilizados como controles positivos. Os resultados são expressos como a média \pm E.P.M. de 10 animais por grupo (Teste de Newman-Keuls). DZP=diazepam, FXT=fluoxetina, CAF=cafeína.

3.2. Teste do LCE

Os efeitos do tratamento crônico da administração oral do EE da *C. paludosa* (1, 10 ou 100 mg/kg), veículo (10 mL/kg) ou DZP (1 mg/kg, controle positivo), em proles adultas de ratas expostas ao EtOH durante o período gestacional e lactacional, avaliadas no teste do LCE, estão demonstrados no gráfico 11 A-C.

ANOVA de uma via revelou efeitos significantes para os fatores de tratamento na %EBA ($F_{(8,89)} = 19,81$; $p \leq 0,0001$) (Gráfico 11 A), na %TBA ($F_{(8,89)} = 11,71$; $p \leq 0,0001$) (Gráfico 11 B), mas não significante para o número de EBF ($F_{(8,89)} = 1,972$; $p = 0,0605$) (Gráfico 11 C). O teste de Newman-Keuls revelou uma redução significante na %EBA (Gráfico 11 A) e na %TBA (Gráfico 11 B) na exposição prenatal e lactacional ao EtOH, indicando um comportamento do tipo ansiogênico nesses animais quando comparados aos controles tratados com o veículo.

Além disso, a administração crônica com o EE da *C. paludosa* (1, 10 ou 100 mg/kg) produziu um aumento na %EBA no teste do LCE (Gráfico 11 A) e a dose de 100 mg/kg favoreceu um aumento na %TBA (Gráfico 11 B). Esses dados indicam que o tratamento com o EE da *C. paludosa* foi capaz de reduzir o comportamento do tipo ansiogênico produzido pela exposição prenatal e lactacional ao EtOH em proles adultas.

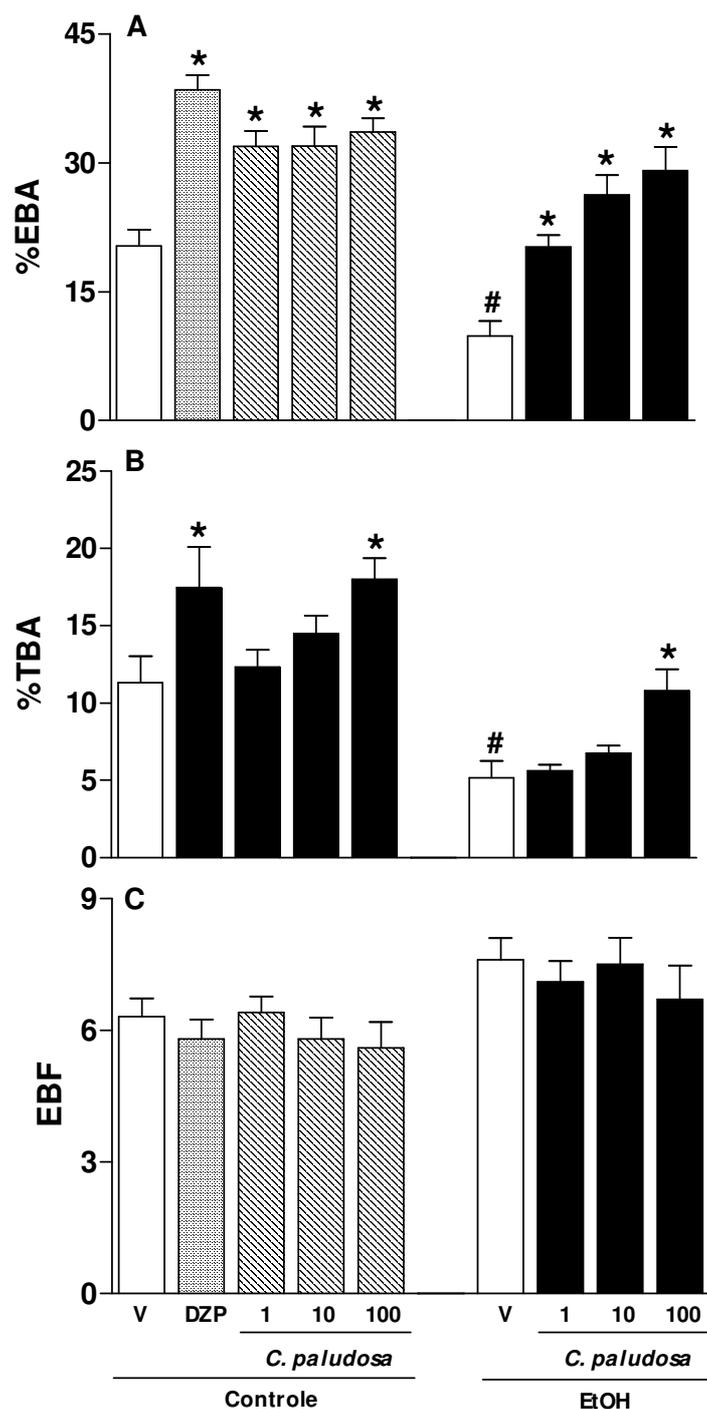


Gráfico 11: Efeito da administração crônica do EE da *C. paludosa* (1, 10 ou 100 mg/kg, v.o.) ou veículo (V) na percentagem de entradas nos braços abertos (%EBA) (A), na percentagem do tempo nos braços abertos (%TBA) (B) e no número de entradas nos braços fechados (EBF) (C), em proles adultas de ratas expostas ao EtOH durante o período gestacional e lactacional, avaliadas no teste do LCE, durante 5 min. DZP (1 mg/Kg, v.o.) foi utilizado como controle positivo. Os resultados são expressos como a média ± E.P.M. de 10 animais por grupo. * $p < 0,05$ difere significativamente quando comparado ao tratamento com veículo do mesmo grupo. # $p < 0,05$ difere significativamente quando comparado ao tratamento com veículo do grupo controle (Teste de Newman-Keuls). DZP=diazepam.

3.3. Teste do nado forçado

Os efeitos do tratamento crônico da administração oral do EE da *C. paludosa* (1, 10 ou 100 mg/kg), veículo (10 mL/kg) ou FXT (10 mg/kg, controle positivo), em proles adultas de ratas expostas ao EtOH durante o período gestacional e lactacional, avaliadas no teste do nado forçado, estão demonstrados no gráfico 12 A-C.

ANOVA de uma via revelou efeitos significantes para os fatores de tratamento no tempo de subida ($F_{(8,89)} = 4,910$; $p \leq 0,0001$) (Gráfico 12 A), no tempo de nado ($F_{(8,89)} = 9,530$; $p \leq 0,0001$) (Gráfico 12 B), e no tempo de imobilidade ($F_{(8,89)} = 11,94$; $p \leq 0,0001$) (Gráfico 12 C) dos animais.

O teste de Newman-Keuls revelou que as proles de ratos adultos, nascidas de mães expostas ao EtOH durante o período gestacional e lactacional, não apresentaram comportamento do tipo depressivo, que deveria ter sido sugerido por uma redução significativa nos tempos de subida e nado e por um aumento no tempo de imobilidade durante o teste do nado forçado. Entretanto, o tratamento crônico com o EE da *C. paludosa* apresentou um comportamento do tipo antidepressivo comparado ao grupo controle, resultando no aumento do tempo de subida (Gráfico 12 A) e uma redução significativa no tempo de imobilidade (Gráfico 12 C), no teste do nado forçado.

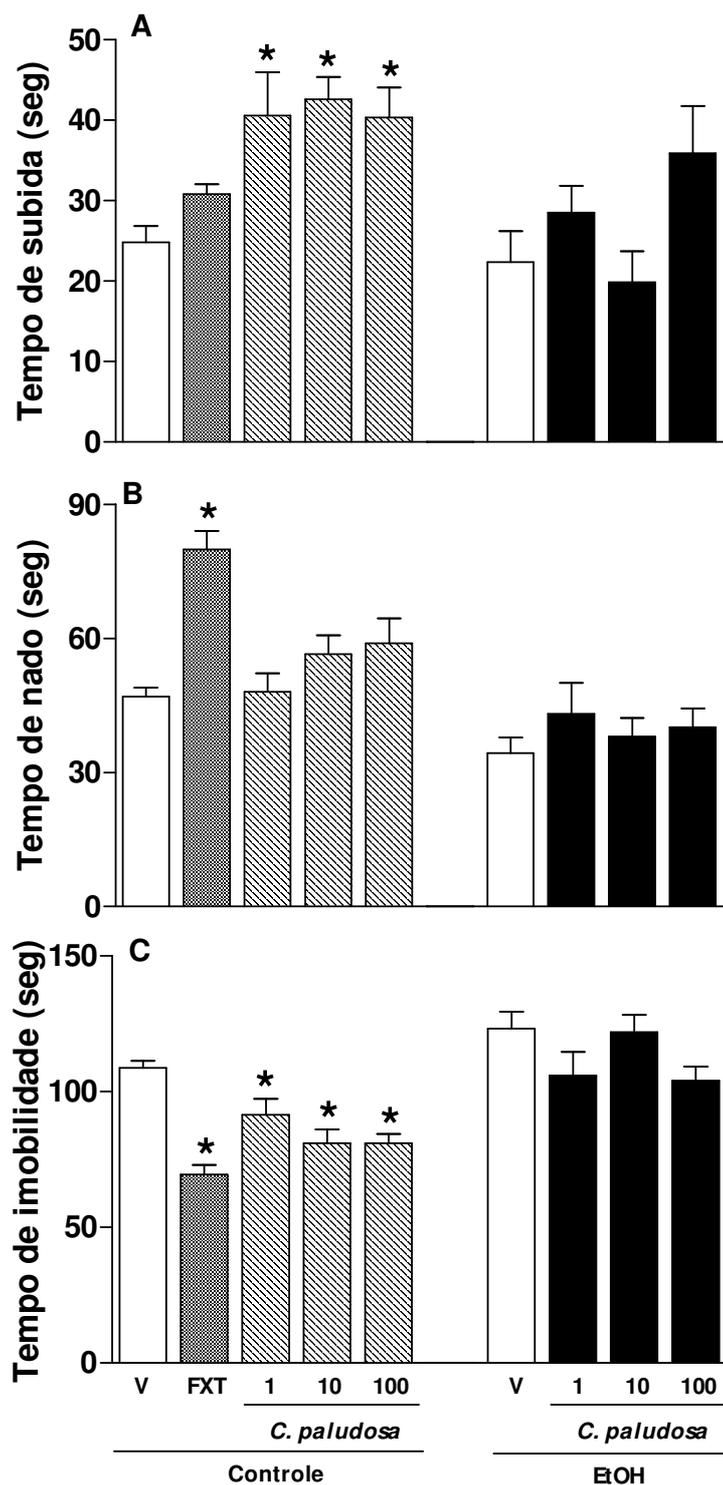


Gráfico 12: Efeito da administração crônica do EE da *C. paludosa* (1, 10 ou 100 mg/kg, v.o.) ou veículo (V) no tempo de subida (A), no tempo de nado (B) e no tempo de imobilidade (C) de proles adultas de ratas expostas ao EtOH durante o período gestacional e lactacional, avaliadas no teste do nado forçado, durante 3 min. FXT (10 mg/Kg, v.o.) foi utilizado como controle positivo. Os resultados são expressos como a média \pm E.P.M. de 10 animais por grupo. * $p < 0,05$ difere significativamente quando comparado ao tratamento com veículo do mesmo grupo. # $p < 0,05$ difere significativamente quando comparado ao tratamento com veículo do grupo controle (Teste de Newman-Keuls). FXT=fluoxetina.

3.4. Testes de memória

- Reconhecimento social

O gráfico 13 mostra os resultados do tratamento crônico da administração oral do EE da *C. paludosa* (1, 10 ou 100 mg/kg), veículo (10 mL/kg) ou CAF (10 mg/kg, v.o., controle positivo) em proles adultas de ratas expostas ao EtOH durante o período gestacional e lactacional, na memória de reconhecimento social de ratos quando um mesmo rato jovem foi re-exposto, depois de um período de 30 min da primeira apresentação.

ANOVA de uma via revelou um efeito significativo para o tratamento com o EE ($F_{(17,179)}=24,69$; $p<0,0001$) no tempo de investigação, durante a segunda apresentação do mesmo rato jovem (Gráfico 13). Ao contrário, os animais do grupo do EtOH apresentaram um significativo déficit cognitivo na memória social, não sendo capazes de reconhecer o animal jovem durante a segunda apresentação.

O gráfico 13 também mostra que o EE da *C. paludosa* não foi capaz de reverter estes déficits cognitivos ocasionados pela administração do EtOH. O teste de Newman-Keuls mostrou que, nesse tempo, os ratos tratados com CAF ou com o EE da *C. paludosa* (1, 10 ou 100 mg/kg), apresentaram uma redução significativa no tempo de investigação durante a segunda apresentação do rato jovem familiar, sugerindo um efeito facilitador da memória social.

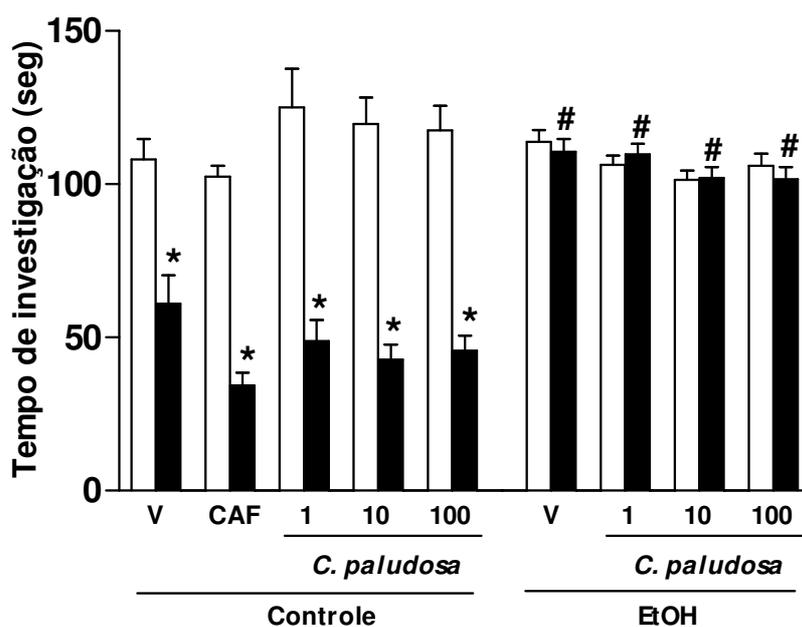


Gráfico 13: Efeito da administração crônica do EE da *C. paludosa* (1, 10 ou 100 mg/kg, v.o.), veículo (V) ou CAF (10 mg/kg, controle positivo, v.o.) no tempo de investigação social de ratos adultos expostos ao EtOH durante o período gestacional e lactacional, quando um mesmo rato jovem foi re-exposto ao rato adulto, após um intervalo de 30 min da primeira apresentação. Os resultados são expressos como a média \pm E.P.M. de 10 animais por grupo. As barras representam o tempo de investigação na primeira (barras brancas) e segunda (barras pretas) apresentação. * $p < 0,05$ difere significativamente quando comparado à primeira apresentação do mesmo grupo. # $p < 0,05$ difere significativamente quando comparado à segunda apresentação do grupo controle tratado com o veículo (Teste de Newman-Keuls). CAF=caféina.

O gráfico 14 mostra os resultados do tratamento crônico da administração oral do EE da *C. paludosa* (0,5, 1, 10 ou 100 mg/kg), veículo (10 mL/kg) ou CAF (10 mg/kg, v.o., controle positivo) em proles adultas de ratas expostas ao EtOH durante o período gestacional e lactacional, na memória de reconhecimento social de ratos, após de um período de 120 min.

A ANOVA de uma via revelou um efeito significativo para o tratamento com o EE ($F_{(17,179)}=13,25$; $p < 0,0001$) no tempo de investigação durante a segunda apresentação do mesmo rato jovem familiar (Gráfico 14 A). Entretanto, os animais do grupo do EtOH e veículo não foram capazes de reconhecer o animal jovem durante a segunda apresentação (após 120 min da primeira exposição).

Posteriormente, o teste de Newman-Keuls mostrou que, nesse tempo, os ratos tratados com CAF ou com o EE da *C. paludosa* (1, 10 ou 100 mg/kg) apresentaram uma redução significativa no tempo de investigação durante a segunda apresentação do rato jovem familiar, sugerindo um efeito facilitador da memória social (Gráfico 14 A). Contudo, os resultados com o EE da *C. paludosa* parecem ser específicos sobre a memória social de ratos adultos, uma vez que a redução no tempo de investigação não foi observada quando um rato jovem, diferente daquele utilizado durante o primeiro encontro, foi apresentado na segunda exposição (Gráfico 14 B).

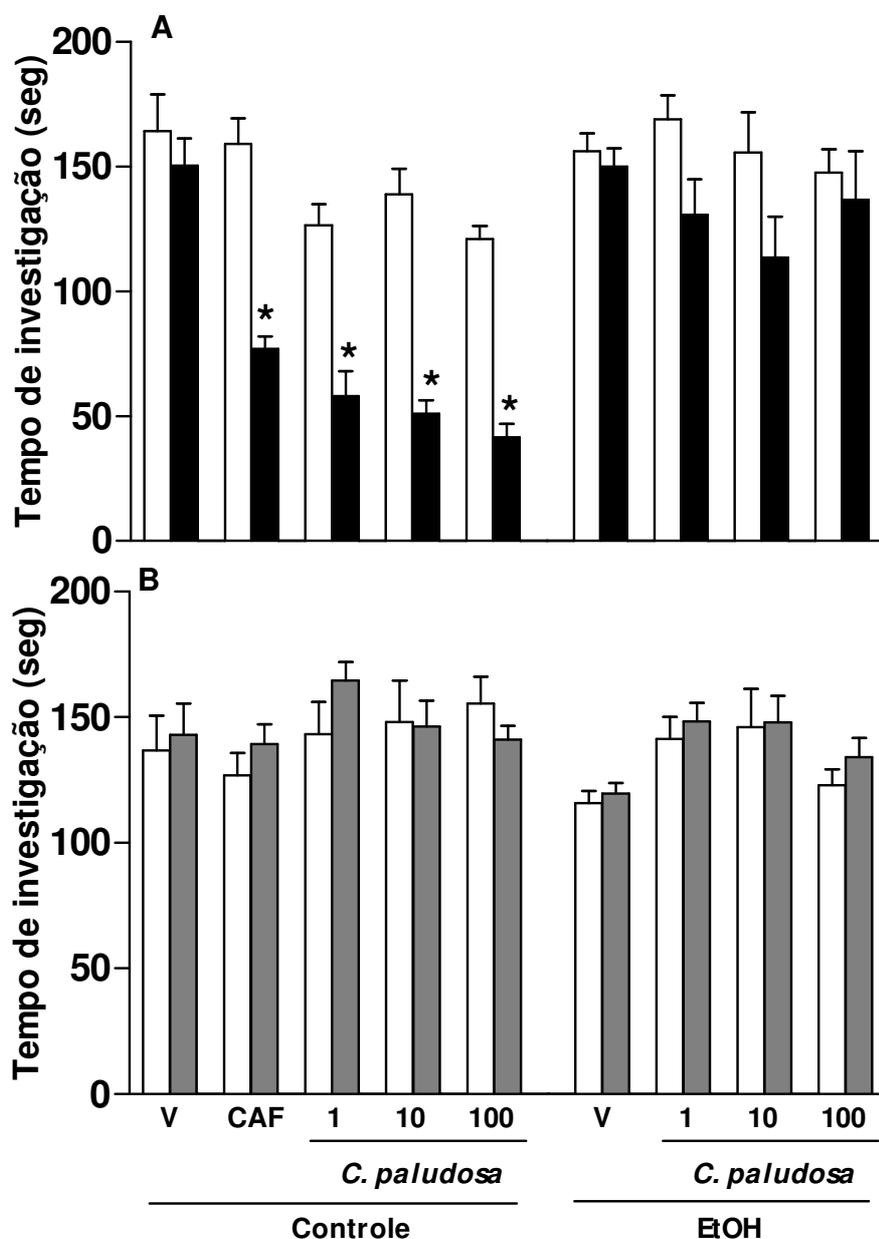


Gráfico 14: Efeito da administração crônica do EE da *C. paludosa* (1, 10 ou 100 mg/kg, v.o.), veículo (V) ou CAF (10 mg/kg, controle positivo, v.o.) no tempo de investigação social de ratos adultos expostos ao EtOH durante o período gestacional e lactacional, quando um mesmo rato jovem (A) ou um rato jovem diferente (B) foi re-exposto ao rato adulto após um intervalo de 120 min da primeira apresentação. Os resultados são expressos como a média \pm E.P.M. de 10 animais por grupo. As barras representam o tempo de investigação na primeira (barras brancas) e segunda (barras pretas ou cinzas) apresentação. * $p < 0,05$ difere significativamente quando comparado à primeira apresentação do mesmo grupo. # $p < 0,05$ difere significativamente quando comparado à segunda apresentação do grupo controle tratado com o veículo (Teste de Newman-Keuls). CAF=caféina.

- **Esquiva inibitória do tipo “step-down”**

Os resultados do tratamento crônico da administração oral do EE da *C. paludosa* (0,5, 1, 10 ou 100 mg/kg), veículo (10 mL/kg) ou CAF (10 mg/kg, v.o., controle positivo) em proles adultas de ratas expostas ao EtOH durante o período gestacional e lactacional, na memória espacial de curta e longa duração de ratos, avaliados no teste a esquiva inibitória do tipo “step-down”, estão demonstrados no gráfico 15.

O teste não paramétrico de Kruskal-Wallis revelou um efeito significativo para o tratamento na latência dos animais na MCD ($H(8, N=18)=145,6; p<0,0001$) e na MLD ($H(8, N=18)=149,4; p<0,0001$). Subsequente, o teste de Mann-Whitney indicou que o tratamento com o EE da *C. paludosa* (1, 10 ou 100 mg/kg) e CAF (10 mg/kg), 60 min antes da sessão treino, aumentou significativamente a latência dos animais na MCD e na MLD, melhorando a memória espacial destes animais quando comparados aos animais controles (Gráfico 15). Entretanto, o teste mostrou que os animais do grupo EtOH apresentaram déficits cognitivos quando comparados aos animais tratados com o veículo do grupo controle. Este efeito foi revertido pelo tratamento com o EE da *C. paludosa*.

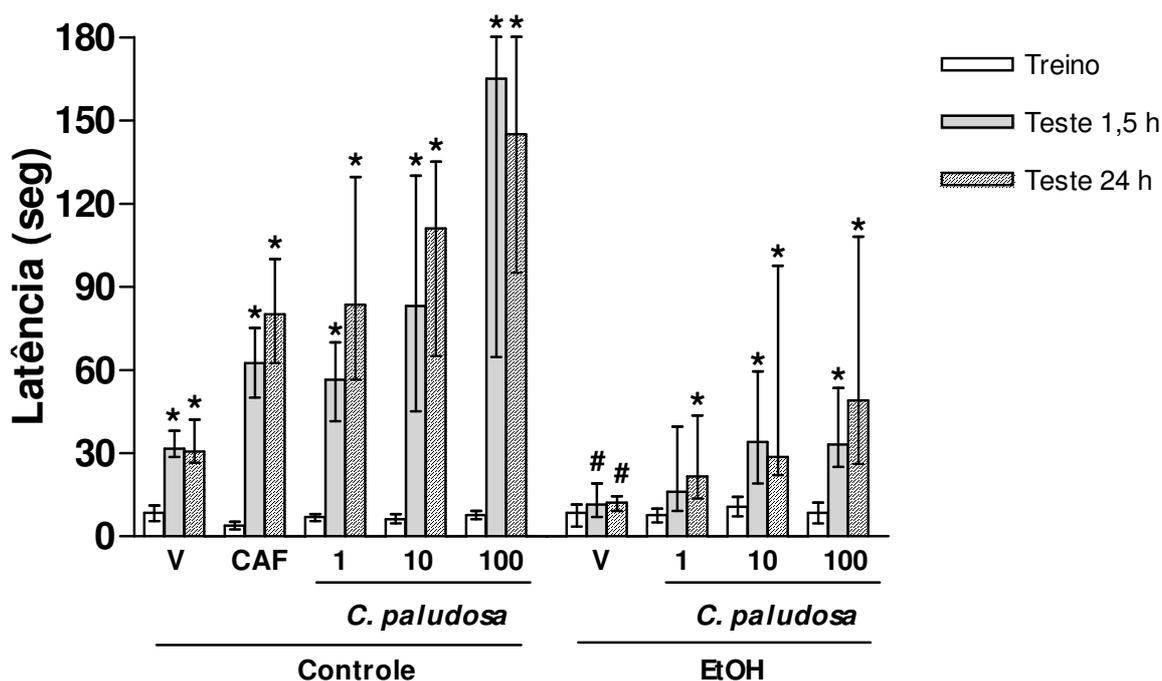


Gráfico 15: Efeito da administração crônica do EE da *C. paludosa* (1, 10 ou 100 mg/kg, v.o.), veículo (V) ou CAF (10 mg/kg, controle positivo, v.o.), na retenção da memória de curta (1,5 h) e longa (24 h) duração de ratos adultos expostos ao EtOH durante o período gestacional e lactacional, avaliados no teste da esQUIVA inibitória do tipo “step-down” (n=10 por grupo). Os dados estão expressos como as medianas (intervalo enterquartis) das latências de descida da plataforma nas sessões treino (barras brancas) e teste (1,5 h: barras cinzas; 24 h: barras hachuradas). * $p < 0,05$ difere significativamente quando comparado à respectiva sessão do grupo controle. # $p < 0,05$ difere significativamente quando comparado à respectiva sessão do grupo tratado (Teste de Mann-Whitney). CAF=caféina.

3.5. Testes bioquímicos

3.5.1. Atividade de enzimas antioxidantes

- Catalase

O gráfico 16 mostra os resultados da atividade da catalase nos tecidos cerebrais em proles adultas de ratas expostas ao EtOH durante o período gestacional e lactacional, bem como o tratamento crônico da administração oral do EE da *C. paludosa* (1, 10 ou 100 mg/kg) ou veículo (10 mL/kg). As análises estatísticas realizadas pela ANOVA de uma via indicou um efeito significativo para

o tratamento nos tecidos cortical ($F_{(7,23)}=3,462$; $p=0,0188$), hipocampal ($F_{(7,23)}=10,59$; $p<0,0001$) e cerebelar ($F_{(7,23)}=4,221$; $p=0,0081$).

O teste de Newman-Keuls, por sua vez, indicou que o EE da *C. paludosa* aumentou a atividade da catalase na dose de 100 mg/kg no tecido cortical e nas três doses no tecido hipocampal dos animais controles, sem alterar a atividade da enzima no tecido cerebelar (Gráfico 16 A, B e C), respectivamente. Esse mesmo efeito foi observado nas proles cujas mães foram expostas ao EtOH, onde o EE da *C. paludosa* aumentou a atividade da catalase no tecido hipocampal na dose de 100 mg/kg (Gráfico 16 B) e no tecido cerebelar na dose de 10 mg/kg (Gráfico 16 C).

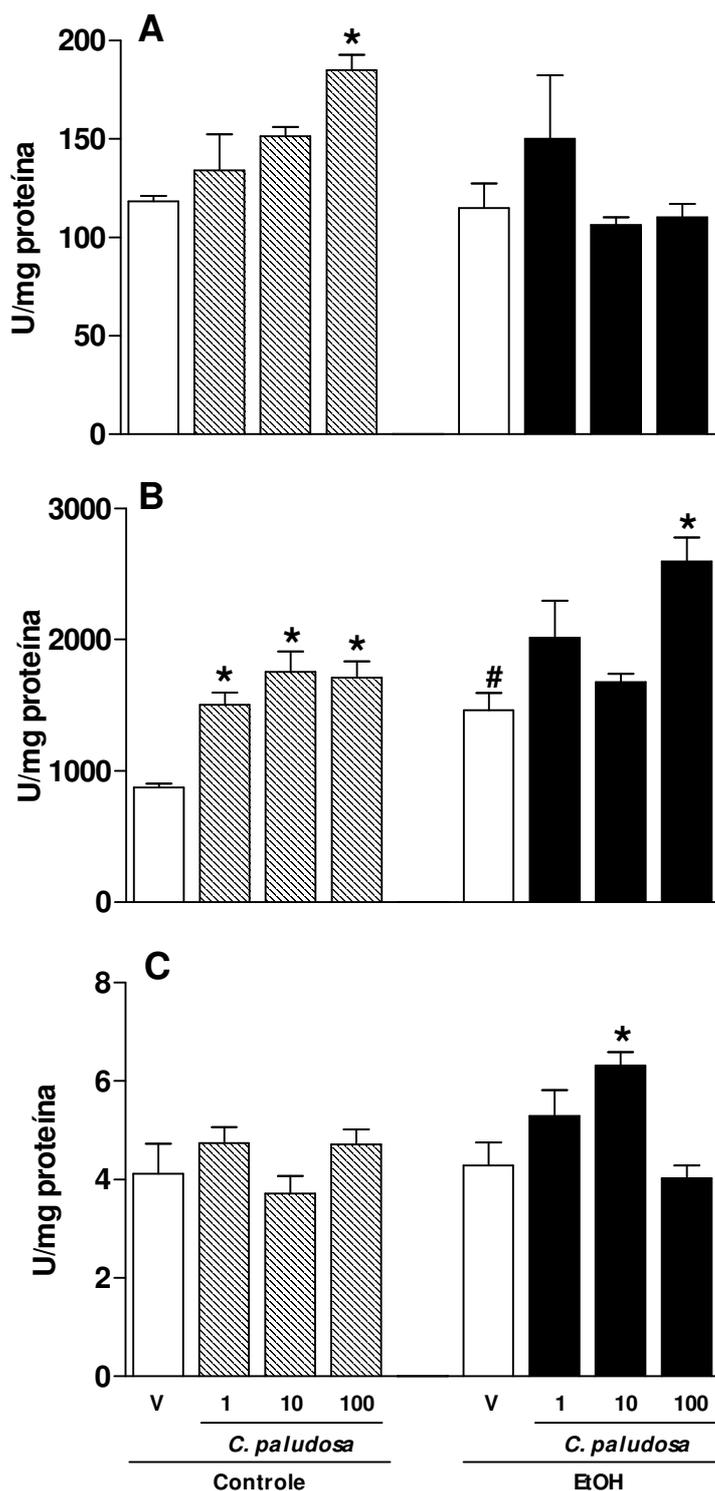


Gráfico 16: Efeito da administração crônica do EE da *C. paludosa* (1, 10 ou 100 mg/kg, v.o.) ou veículo (V) na atividade da catalase de tecidos cerebrais de proles adultas de ratas expostas ao EtOH durante o período gestacional e lactacional. Os resultados são expressos como a média \pm E.P.M. de 3 animais por grupo dos níveis da atividade da catalase nos tecidos cortical (A), hipocampal (B) e cerebelar (C). * $p < 0,05$ difere significativamente quando comparado ao tratamento com veículo do mesmo grupo. # $p < 0,05$ difere significativamente quando comparado ao tratamento com veículo do grupo controle (Teste de Newman-Keuls).

O gráfico 17 mostra os resultados da atividade da catalase no tecido de fígado de proles adultas de ratas expostas ao EtOH durante o período gestacional e lactacional, bem como o tratamento crônico da administração oral do EE da *C. paludosa* (1, 10 ou 100 mg/kg) ou veículo (10 mL/kg).

ANOVA de uma via indicou um efeito significativo para o tratamento ($F_{(7,23)}=18,03$; $p<0,0001$), onde o teste de Newman-Keuls mostrou que o EE da *C. paludosa* não aumentou a atividade da catalase nas doses de 1 e 10 mg/kg nos animais controles, e nas três doses nos animais do grupo do EtOH. Além disso, o teste mostrou que o tratamento dos animais com o EtOH, durante o período gestacional e lactacional, induziu a atividade da catalase nas proles adultas, mostrando um possível efeito protetor no fígado destes animais contra a exposição ao EtOH.

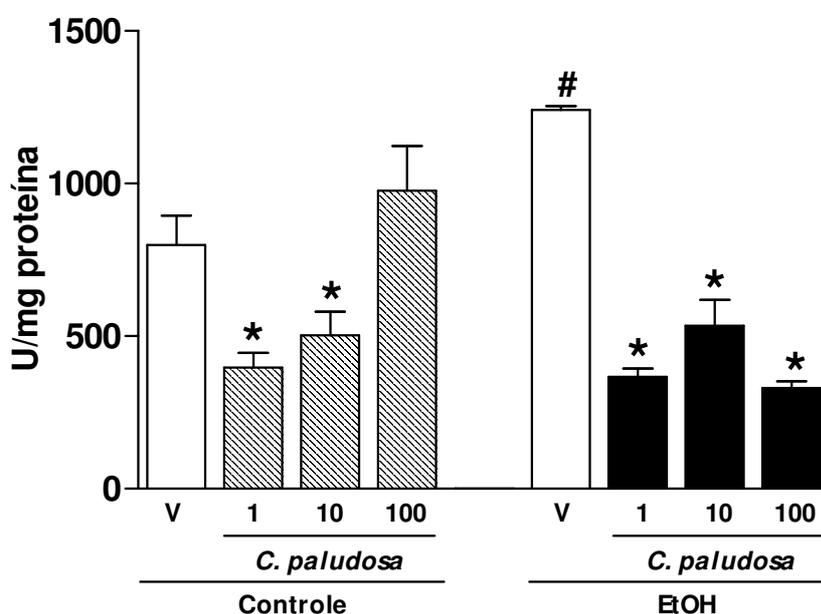


Gráfico 17: Efeito da administração crônica do EE da *C. paludosa* (1, 10 ou 100 mg/kg, v.o.) ou veículo (V) na atividade da catalase no tecido de fígado de proles adultas de ratas expostas ao EtOH, durante o período gestacional e lactacional. Os resultados são expressos como a média \pm E.P.M. de 3 animais por grupo. * $p<0,05$ difere significativamente quando comparado ao tratamento com veículo do mesmo grupo. # $p<0,05$ difere significativamente quando comparado ao tratamento com veículo do grupo controle. (Teste de Newman-Keuls).

- **Glutathiona peroxidase dependente de selênio**

O gráfico 18 mostra os resultados da atividade da Se-GPx nos tecidos cerebrais em proles adultas de ratas expostas ao EtOH durante o período gestacional e lactacional, bem como o tratamento crônico da administração oral do EE da *C. paludosa* (1, 10 ou 100 mg/kg) ou veículo (10 mL/kg). As análises estatísticas realizadas pela ANOVA de uma via indicou um efeito significativo para o tratamento nos tecidos cortical ($F_{(7,23)}=44,56$; $p<0,0001$) e cerebelar ($F_{(7,23)}=11,42$; $p<0,0001$) sem alterar a atividade da enzima no tecido hipocampal (Gráfico 18 A, B e C), respectivamente.

O teste de Newman-Keuls indicou que o EE da *C. paludosa* nas três doses aumentou a atividade da Se-GPx no tecido cortical e cerebelar dos animais controles, sem alterar a atividade da enzima no tecido hipocampal (Gráfico 18 A, C e B), respectivamente. Esse mesmo efeito foi observado nas proles cujas mães foram expostas ao EtOH, onde o EE da *C. paludosa*, em todas as doses, aumentou a atividade da Se-GPx no tecido cortical (Gráfico 18 A) e no tecido cerebelar (Gráfico 18 C) onde a atividade da Se-GPx se mostrou reduzida quando comparado ao grupo tratado com o veículo dos animais controles.

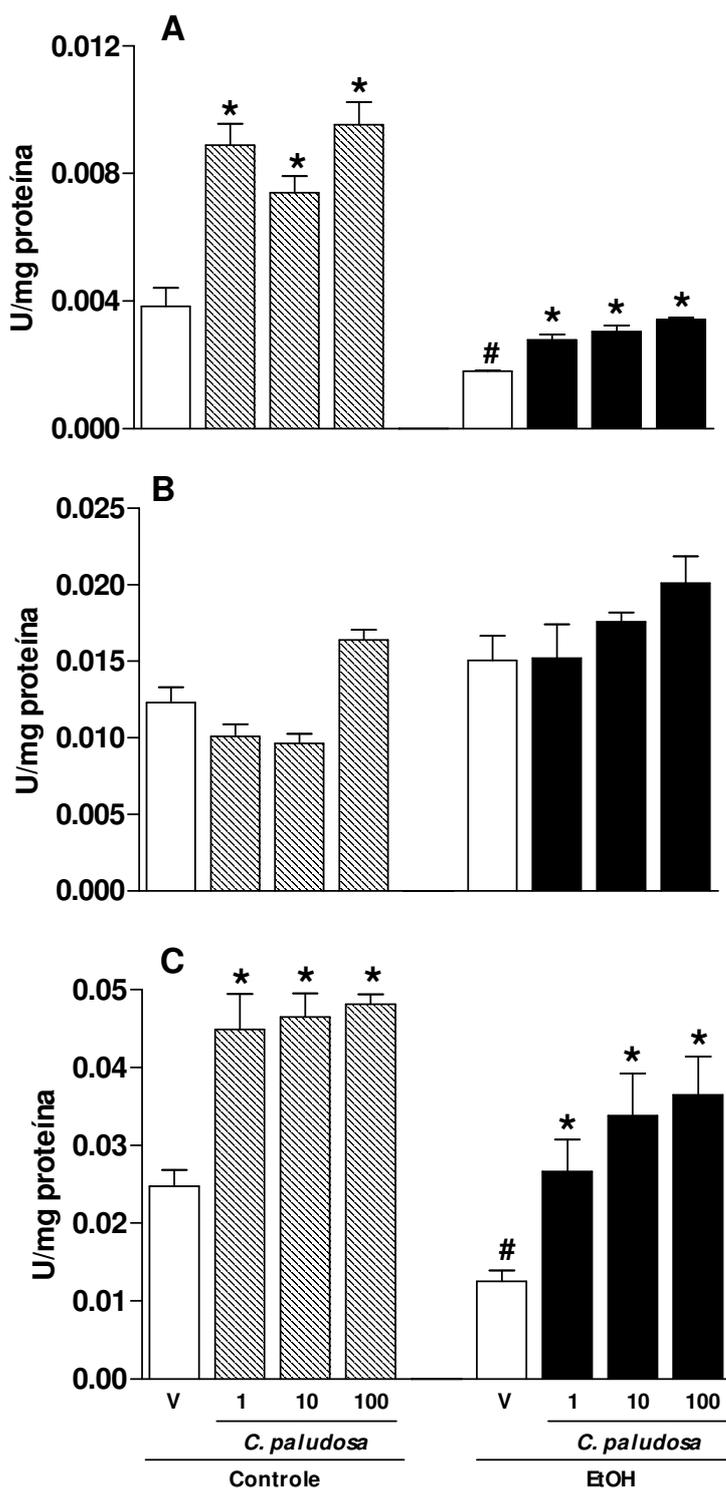


Gráfico 18: Efeito da administração crônica do EE da *C. paludosa* (1, 10 ou 100 mg/kg, v.o.) ou veículo (V) na atividade da glutatona peroxidase dependente de selênio em tecidos cerebrais de proles adultas de ratos expostas ao EtOH, durante o período gestacional e lactacional. Os resultados são expressos como a média \pm E.P.M. de 3 animais por grupo dos níveis da atividade da catalase nos tecidos cortical (A), hipocampal (B) e cerebelar (C). * $p < 0,05$ difere significativamente quando comparado ao tratamento com veículo do mesmo grupo. # $p < 0,05$ difere significativamente quando comparado ao tratamento com veículo do grupo controle (Teste de Newman-Keuls).

O gráfico 19 mostra os resultados da atividade da Se-GPx no tecido de fígado de proles adultas de ratas expostas ao EtOH durante o período gestacional e lactacional, bem como o tratamento crônico da administração oral do EE da *C. paludosa* (1, 10 ou 100 mg/kg) ou veículo (10 mL/kg). ANOVA de uma via não indicou qualquer efeito significativo para o tratamento ($F_{(7,23)}=0,8463$; $p=0,5663$).

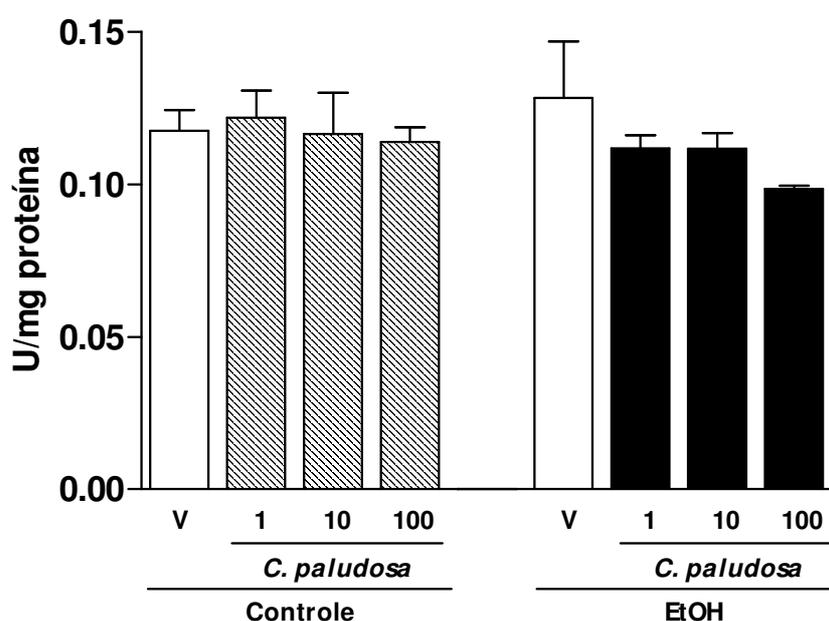


Gráfico 19: Efeito da administração crônica do EE da *C. paludosa* (1, 10 ou 100 mg/kg, v.o.) ou veículo (V) na atividade da glutatona peroxidase dependente de selênio no tecido de fígado de proles adultas de ratas expostas ao EtOH, durante o período gestacional e lactacional. Os resultados são expressos como a média \pm E.P.M. de 3 animais por grupo.

3.5.2. Indicadores de danos oxidativos

- Peroxidação lipídica pelo método de TBARS

O gráfico 20 mostra os resultados dos níveis de TBARS nos tecidos cerebrais de proles adultas de ratas expostas ao EtOH durante o período gestacional e lactacional, bem como o tratamento crônico da administração oral do EE da *C. paludosa* (1, 10 ou 100 mg/kg) ou veículo (10 mL/kg). As análises

estatísticas realizadas pela ANOVA de uma via indicou um efeito significativo para o tratamento nos tecidos cortical ($F_{(7,23)}=3,073$; $p=0,0298$), hipocampal ($F_{(7,23)}=13,66$; $p<0,0001$) e cerebelar ($F_{(7,23)}=29,24$; $p<0,0001$) (Gráfico 20 A, B e C), respectivamente.

O teste de Newman-Keuls indicou que o tratamento com o EtOH aumentou os níveis de TBARS nos tecidos hipocampal e cerebelar, sem alterar os níveis de TBARS no tecido cortical (Gráfico 20 B, C e A), respectivamente. As três doses do EE da *C. paludosa* reverteu o efeito dos níveis da peroxidação lipídica induzida pelo EtOH nos tecidos hipocampal (Gráfico 20 B) e cerebelar (Gráfico 20 C), onde os níveis de TBARS mostraram-se reduzidos quando comparados ao grupo tratado com o EtOH, sugerindo um possível efeito protetor do EE da *C. paludosa*.

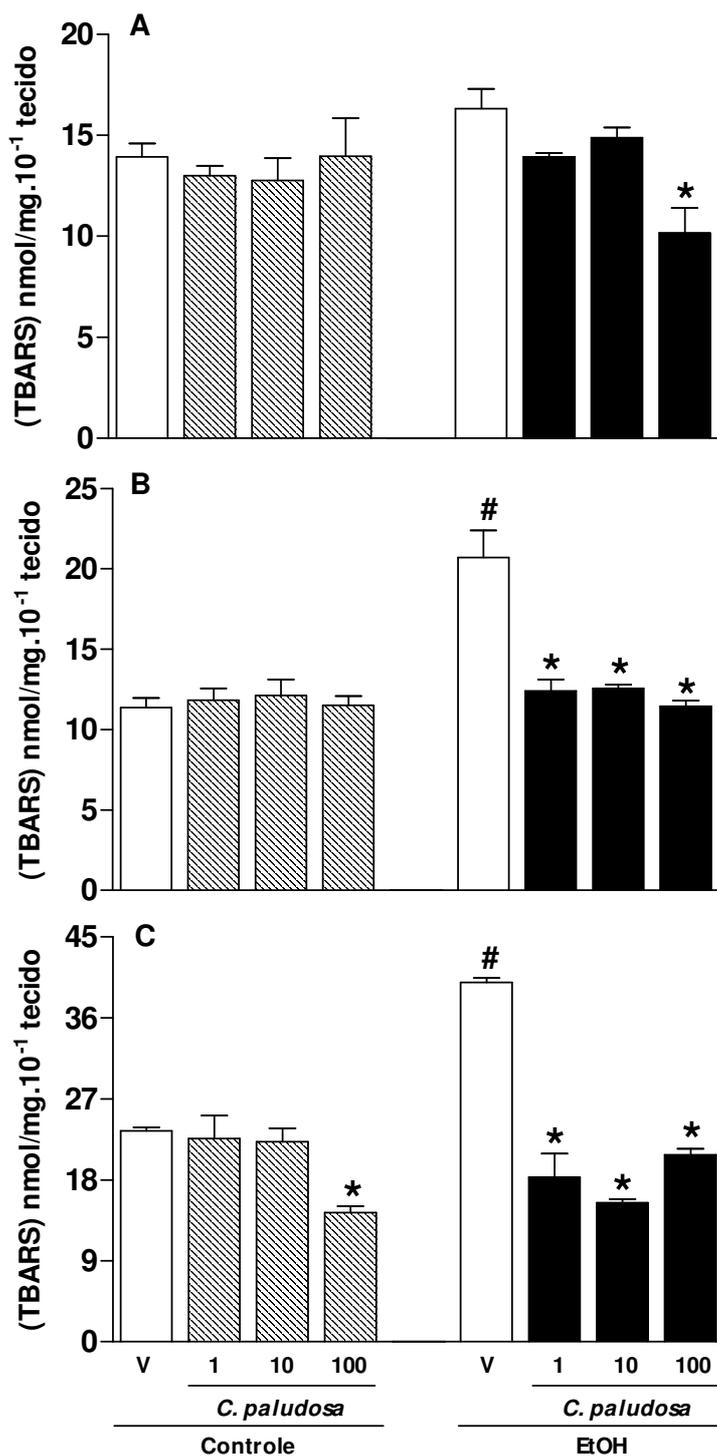


Gráfico 20: Efeito da administração crônica do EE da *C. paludosa* (1, 10 ou 100 mg/kg, v.o.) ou veículo (V) na peroxidação lipídica em tecidos cerebrais de proles adultas de ratas expostas ao EtOH, durante o período gestacional e lactacional. Os resultados são expressos como a média \pm E.P.M. de 3 animais por grupo dos níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) nos tecidos cortical (A), hipocampal (B) e cerebelar (C). * $p < 0,05$ difere significativamente quando comparado ao tratamento com veículo do mesmo grupo. # $p < 0,05$ difere significativamente quando comparado ao tratamento com veículo do grupo controle (Teste de Newman-Keuls).

O gráfico 21 mostra os resultados dos níveis de TBARS no tecido de fígado de proles adultas expostas ao EtOH, durante o período gestacional e lactacional, bem como o tratamento crônico da administração oral do EE da *C. paludosa* (1, 10 ou 100 mg/kg) ou veículo (10 mL/kg). A análise estatística realizada pela ANOVA de uma via mostrou um efeito significativo para o tratamento ($F_{(7,23)}=120,2; p<0.0001$). O teste de Newman-Keuls indicou que o tratamento com o EtOH aumentou os níveis de TBARS e que esse efeito foi revertido pelo tratamento com as três doses do EE da *C. paludosa*.

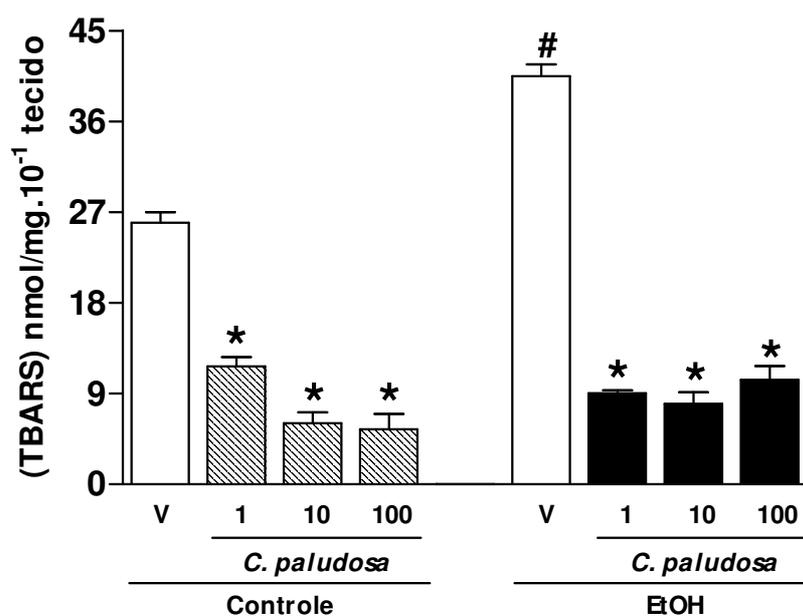


Gráfico 21: Efeito da administração crônica do EE da *C. paludosa* (1, 10 ou 100 mg/kg, v.o.) ou veículo (V) na peroxidação lipídica em tecido de fígado de proles adultas de ratas expostas ao EtOH, durante o período gestacional e lactacional. Os resultados são expressos como a média \pm E.P.M. de 3 animais por grupo dos níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). * $p<0,05$ difere significativamente quando comparado ao tratamento com veículo do mesmo grupo. # $p<0,05$ difere significativamente quando comparado ao tratamento com veículo do grupo controle. (Teste de Newman-Keuls).

- Peroxidação lipídica pelo método de alaranjado de xilenol

A concentração de equivalentes de hidroperóxido de cumeno nos tecidos cerebrais de proles adultas de ratas expostas ao EtOH, durante o período gestacional e lactacional, bem como o tratamento crônico da administração oral do EE da *C. paludosa* (1, 10 ou 100 mg/kg) ou veículo (10 mL/kg) estão demonstrados no gráfico 22. As análises estatísticas realizadas pela ANOVA de uma via mostraram um efeito significativo para o tratamento nos tecidos cortical ($F_{(7,23)}=23,75$; $p<0,0001$), hipocampal ($F_{(7,23)}=55,57$; $p<0,0001$) e cerebelar ($F_{(7,23)}=16,79$; $p<0,0001$) (Gráfico 22 A, B e C), respectivamente.

O teste de Newman-Keuls indicou que o tratamento com o EtOH aumentou as concentrações de equivalentes de hidroperóxido de cumeno nos três tecidos cerebrais (Gráfico 22 A, B e C); e este efeito foi revertido pelas três doses do EE da *C. paludosa*. Estes resultados confirmam os resultados obtidos no teste de TBARS, sugestivos de um possível efeito protetor do EE.

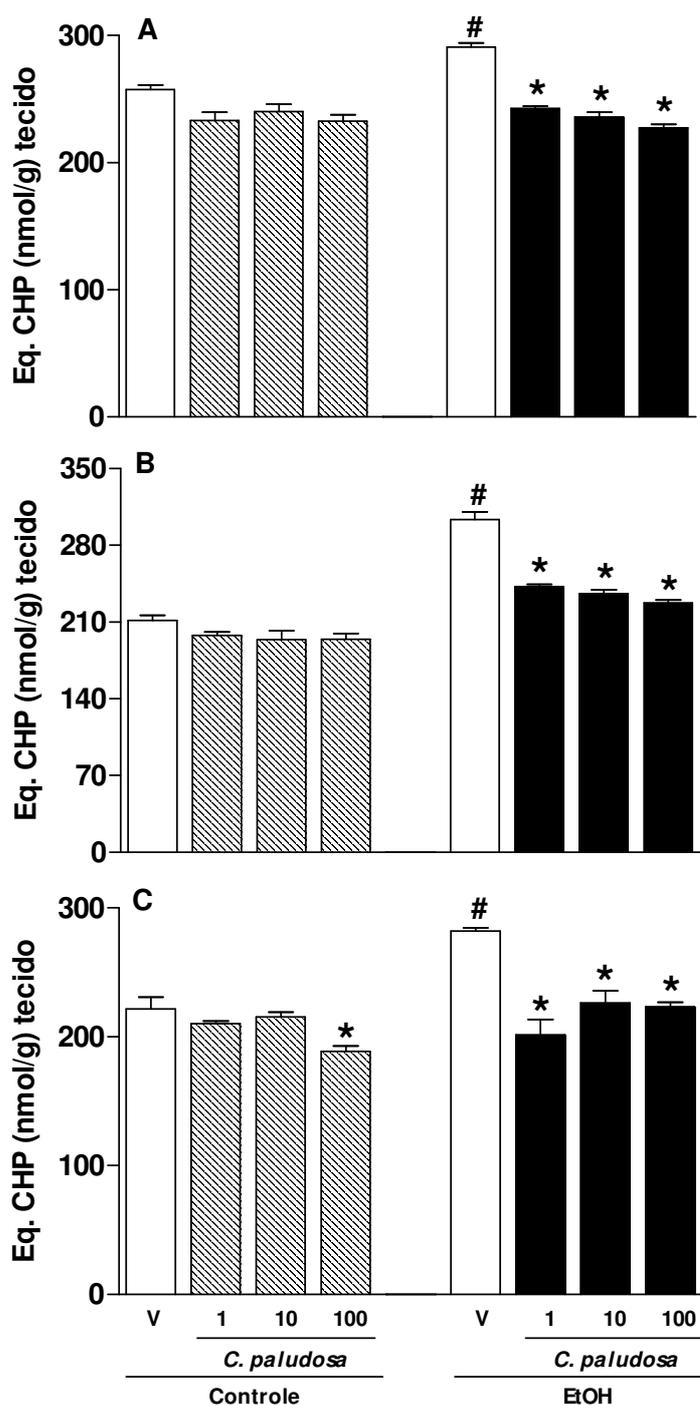


Gráfico 22: Efeito da administração crônica do EE da *C. paludosa* (1, 10 ou 100 mg/kg, v.o.) ou veículo (V) na concentração de equivalentes de hidroperóxido de cumeno (Eq. CHP) nos tecidos cerebrais de proles adultas de ratas expostas ao EtOH, durante o período gestacional e lactacional. Os resultados são expressos como a média ± E.P.M. de 3 animais por grupo dos níveis de Eq. CHP nos tecidos cortical (A), hipocampal (B) e cerebelar (C). * $p < 0,05$ difere significativamente quando comparado ao tratamento com veículo do mesmo grupo. # $p < 0,05$ difere significativamente quando comparado ao tratamento com veículo do grupo controle (Teste de Newman-Keuls).

O gráfico 23 mostra a concentração de equivalentes de hidroperóxido de cumeno no tecido de fígado de proles adultas de ratas expostas ao EtOH, durante o período gestacional e lactacional, bem como o tratamento crônico da administração oral do EE da *C. paludosa* (1, 10 ou 100 mg/kg) ou veículo (10 mL/kg).

As análises estatísticas realizadas pela ANOVA de uma via mostraram um efeito significativo para o tratamento nos tecidos ($F_{(7,23)}=257,2$; $p<0,0001$). O teste de Newman-Keuls indicou que os tratamentos com as três doses do EE diminuiu a concentração de equivalentes de hidroperóxido de cumeno quando comparados ao grupo controle, confirmando os resultados do teste de TBARS. O teste também indicou que o tratamento com o EtOH aumentou as concentração de equivalentes de hidroperóxido nos tecidos cerebrais, e que este efeito foi revertido pelas três doses do EE da *C. paludosa*.

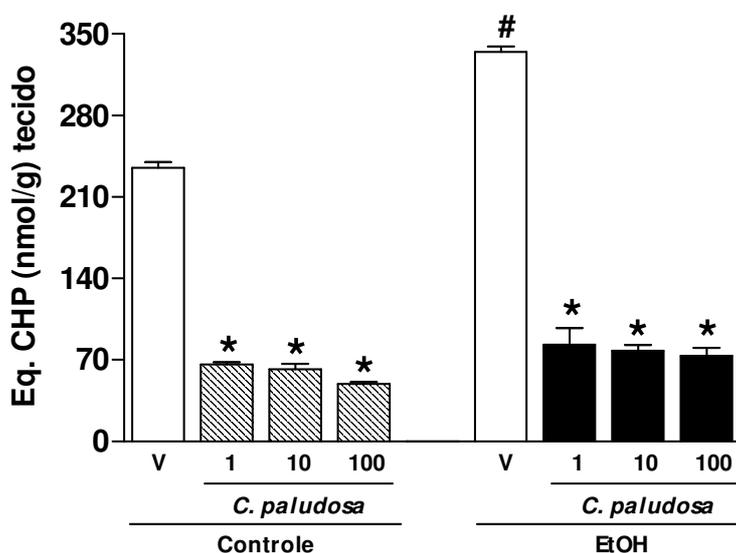


Gráfico 23: Efeito da administração crônica do EE da *C. paludosa* (1, 10 ou 100 mg/kg, v.o.) ou veículo (V) na concentração de equivalentes de hidroperóxido de cumeno (Eq. CHP) no tecido de fígado de proles adultas de ratas expostas ao EtOH durante o período gestacional e lactacional. Os resultados são expressos como a média \pm E.P.M. de 3 animais por grupo dos níveis de Eq. CHP. * $p<0,05$ difere significativamente quando comparado ao tratamento com veículo do mesmo grupo. # $p<0,05$ difere significativamente quando comparado ao tratamento com veículo do grupo controle. (Teste de Newman-Keuls).

4. DISCUSSÃO

Os resultados obtidos no presente estudo demonstraram que o tratamento crônico com o EE dos bulbos da *C. paludosa* nas doses de 1, 10 ou 100 mg/kg, apresentou efeito do tipo ansiolítico ou antidepressivo em animais, quando avaliados no teste do LCE e nado forçado, respectivamente. Além disso, o tratamento com as três doses do EE da *C. paludosa* foi capaz de melhorar ou facilitar processos cognitivos relacionados às memórias do tipo operacional e espacial, quando avaliadas nos testes de memória social e esQUIVA INIBITÓRIA DO TIPO “step-down”, respectivamente. Para descartar qualquer efeito inespecífico do EE da *C. paludosa*, que pudesse interferir nos resultados, foi realizado o teste do campo aberto, onde não se observou qualquer alteração significativa na atividade locomotora dos animais, em todas as doses avaliadas.

Pesquisas têm demonstrado que as espécies da família Iridaceae possuem efeitos benéficos para o tratamento de déficits neurocomportamentais, como prejuízos de memória e déficit de aprendizado e para o tratamento de doenças como a ansiedade e a depressão (Hosseinzadeh e Noraei, 2009; Pitsikas e Sakellaridis, 2006; Pitsikas *e cols.*, 2007; Wang *e cols.*, 2010). Portanto, esses resultados contribuem, ao menos em parte, para a compreensão dos efeitos do gênero *Cipura* no SNC.

Confirmando dados prévios de nosso laboratório (Maia *e cols.*, 2009a), o presente estudo demonstrou que o tratamento diário com o EtOH 22,5% p/v (6,5 g/kg, v.o.) em ratas durante o desenvolvimento do SNC (período gestacional) e período lactacional, produz alterações nas respostas neurocomportamentais em proles adultas, quando avaliadas nos modelos de ansiedade e memória.

Os dados encontrados no presente estudo demonstraram que o tratamento crônico de 14 dias com o EE da *C. paludosa* melhorou esses déficits comportamentais induzidos pela exposição prenatal e lactacional ao EtOH em ratos. O EE da *C. paludosa* (1, 10 ou 100 mg/kg, v.o.) foi capaz de reverter o comportamento do tipo ansiogênico dos animais expostos ao EtOH avaliados no teste do LCE, resultando no aumento da %EBA e %TBA, sem alterar a EBF. Este resultado pode ser comparado com o controle positivo DZP. Esses resultados parecem demonstrar um efeito específico relacionado à ansiedade, visto que a EBF e atividade locomotora dos animais no teste do campo aberto não foram afetadas.

Como discutido por File (1992), a EBF é uma importante medida de atividade geral no teste do LCE, apropriada para indicar se uma droga é ansiolítica ou ansiogênica. Esses dados confirmam aqueles de outros estudos mostrando que o efeito ansiogênico pode ser produzido pela exposição de longa duração do EtOH (da Silva *e cols.*, 2004).

Decidiu-se também investigar os efeitos da exposição prenatal ao EtOH no comportamento do tipo depressivo avaliado no teste do nado forçado, considerado como um modelo animal de depressão (Porsolt *e cols.*, 1978). Ratos que são forçados a nadar em uma área restrita assumem uma postura imóvel após a tentativa inicial de escape, mantendo somente os movimentos mínimos necessários para manter a cabeça acima da água. Dados da literatura têm mostrado que o nado “é sensível” aos componentes serotoninérgicos, tais como os inibidores de recaptção de serotonina, como a FXT (Cryan e Lucki, 2000; Detke *e cols.*, 1995; Holick *e cols.*, 2008; Nakatomi *e cols.*, 2008).

Os dados presentes nesse estudo, usando o teste do nado forçado, demonstraram que o EE da *C. paludosa*, quando administrado cronicamente, produziu uma resposta do tipo antidepressiva em animais. Nesse teste, os animais apresentaram aumento significativo no tempo de nado e uma diminuição no tempo de imobilidade. Tal comportamento não foi observado nos animais expostos prenatalmente ao EtOH, confirmando dados prévios do nosso laboratório (Maia *e cols.*, 2009).

Esses resultados, entretanto, são opostos aqueles mostrando que proles jovens e adultas, de mães tratadas com EtOH, apresentaram uma alta atividade locomotora no teste do campo aberto (Bond e Di Giusto, 1977; Riley *e cols.*, 1986). Neste estudo, foi utilizado EtOH 6,5 g/kg em ratas durante o período gestacional e lactacional e não se observou qualquer diferença quando comparados aos animais controles. A diferença observada entre essa e outras pesquisas pode ser em decorrência do modelo experimental e/ou linhagens usados e/ou a susceptibilidade aos efeitos teratogênicos do EtOH (Becker *e cols.*, 1996).

Alguns extratos ou princípios ativos obtidos a partir de espécies pertencentes à família Iridaceae possuem um amplo espectro de atividades biológicas, incluindo efeitos do tipo antidepressivos (Akhondzadeh Basti *e cols.*, 2007; Lechtenberg *e cols.*, 2008; Wang *e cols.*, 2010).

Em estudos prévios do nosso grupo de pesquisa (Lucena *e cols.*, 2007b) foi demonstrado o EE da *C. paludosa* como um potencial agente em doenças neurológicas relacionadas à excitotoxicidade e ao estresse oxidativo. No presente estudo, foram realizados dois testes para avaliar a cognição dos animais expostos

prenatalmente ao EtOH e tratados cronicamente com o EE da *C. paludosa* (1, 10 ou 100 mg/kg, v.o.). Os testes avaliados foram o de reconhecimento social e esQUIVA inibitória do tipo “*step-down*”, os quais abordam dois tipos diferentes de memória, a memória operacional e a memória espacial, respectivamente.

Nos testes de memória social, os dados do presente estudo mostraram um efeito facilitador da memória em ratos tratados cronicamente com o EE da *C. paludosa* apresentando uma melhora na capacidade de reconhecer um rato jovem, quando este foi re-exposto ao rato adulto, após um período de 120 min da primeira apresentação, sugerindo uma melhora na memória social. Esse efeito se manteve constante quando um rato jovem diferente foi apresentado ao rato adulto após o mesmo intervalo de tempo (120 min). Esse comportamento facilitador da memória não foi observado nos animais do grupo do EtOH. Os resultados mostraram que os animais expostos ao EtOH, durante o período gestacional e lactacional, apresentaram um prejuízo na capacidade de reconhecer um rato jovem, quando re-exposto ao rato adulto após um curto intervalo de tempo de 30 min, sugerindo um prejuízo na memória social.

Este teste é um modelo de memória olfatória de curta duração que pode ser facilitada por drogas que melhoram os processos de aprendizado e memória (Prediger e cols., 2005b; Terranova e cols., 1996), e prejudicada por processos fisiopatológicos (como isquemia, envelhecimento, exposição a neurotóxicos, entre outros) que interferem nos processos de aprendizado e memória (Prediger e cols., 2005a). O que geralmente é aceito nesse tipo de teste é que se o período no qual o animal for avaliado for menor do que 40 min, o rato adulto exibirá reconhecimento do rato jovem, o que será indicado por uma redução significativa

no tempo de investigação social, durante a segunda avaliação (Dantzer e cols., 1987; Prediger e Takahashi, 2005). Entretanto, quando o mesmo animal jovem for re-exposto por um período mais longo (mais que 60 min) após a primeira apresentação, o rato adulto demorará muito mais tempo para reconhecer o rato jovem, isto é, o tempo de investigação social na segunda apresentação será similar aquele observado na primeira avaliação.

Os resultados presentes neste estudo estão de acordo com a literatura, indicando que a exposição prenatal ao EtOH pode acarretar em déficits cognitivos afetando áreas cerebrais envolvidas em processos mnemônicos (Maia e cols., 2009, 2010; Neese e cols., 2004). Os dados do presente estudo são os pioneiros, mostrando o efeito da exposição prenatal e lactacional ao EtOH no modelo de memória social. Segundo Izquierdo (2002), a memória operacional, ou também conhecida como memória de trabalho, utiliza poucas vias nervosas e não deixa traços neuroquímicos ou comportamentais e não produz arquivos de registros. Este tipo de memória é processado fundamentalmente pelo córtex pré-frontal.

A memória espacial foi avaliada no teste da esQUIVA inibitória do tipo “*step-down*”. Os resultados presentes neste estudo demonstraram que o tratamento com todas as doses do EE da *C. paludosa* mostrou um efeito facilitador na retenção da memória de curta e longa duração, quando comparado aos animais do grupo controle. A CAF foi utilizada como controle positivo. Este efeito facilitatório do EE é dissociado de qualquer efeito sedativo ou relaxante inespecífico, como foi comprovado pelo teste de campo aberto realizado nos animais. Entretanto, as proles adultas expostas ao EtOH durante o período gestacional e lactacional apresentaram déficits na memória espacial quando

comparadas aos animais controles, mostrando que os animais do grupo do EtOH apresentaram dificuldades neste tipo de aprendizado.

Estes resultados estão de acordo com trabalhos prévios da literatura que mostram déficits cognitivos na memória espacial de ratos expostos prenatalmente ao EtOH (Furuya e cols., 1996; Neese e cols., 2004). Estudos têm demonstrado que a principal estrutura responsável por esse tipo de memória é o hipocampo. Os dados do presente estudo mostram que o tratamento com o EE da *C. paludosa* reverteu os déficits cognitivos induzidos pela exposição ao EOH.

Tem sido amplamente reconhecido que muitas plantas medicinais podem melhorar a memória e funções cognitivas relacionadas às doenças neurodegenerativas (Chonpathompikunlert e cols., 2010; Ho e cols., 2009; Prediger e cols., 2008), entre elas plantas pertencentes à família Iridaceae (Sugiura e cols., 1994, 1995; Zhang e cols., 1994; Pitisikas e Sakellaridis., 2006; Pitisikas e cols., 2007). O presente trabalho é o primeiro a demonstrar os efeitos do tratamento crônico com o EE da *C. paludosa* em modelos animais de aprendizado e memória.

É bem sabido que o consumo de álcool promove um significativo aumento dos radicais livres em diversas partes do corpo e esse aumento acarreta um desequilíbrio homeostático que afeta órgãos e tecidos conhecido como estresse oxidativo. Este, por sua vez, contribui para a evolução de várias doenças crônicas, entre elas as doenças neurodegenerativas e neuropsíquicas. Tendo em vista, os danos oxidativos aos diversos órgãos e tecidos provocados pela exposição ao EtOH, o presente estudo investigou os efeitos da exposição prenatal ao EtOH e os possíveis efeitos neuroprotetores do EE da *C. paludosa*, nos níveis

de enzimas antioxidantes, tais como a catalase e a Se-GPx que reduzem o H_2O_2 , substância altamente tóxica para a célula, à água (H_2O) e O_2 nos sistemas celulares.

O presente estudo mostrou que o tratamento com o EE da *C. paludosa* apresentou um aumento nos níveis da atividade da catalase nos tecidos cortical e hipocampal de proles adultas. Além disso, esse efeito foi observado no tecido hipocampal de proles adultas expostas prenatalmente ao EtOH, sugerindo um possível mecanismo de defesa do próprio tecido. Entretanto, os níveis de Se-GPx apresentaram baixos nos tecidos cortical e cerebelar, mostrando que a exposição prenatal ao EtOH foi específica para a inibição dos níveis de Se-GPx. Este efeito foi totalmente revertido pelo tratamento crônico com o EE da *C. paludosa*, sugerindo um efeito antioxidante protetor em tecidos cerebrais expostos ao EtOH.

Além disso, os níveis de catalase no fígado apresentaram-se elevados nos animais do grupo do EtOH quando comparados aos animais controles, sugerindo como um mecanismo de auto-defesa do órgão responsável pela metabolização do EtOH. Esses resultados estão de acordo com dados prévios de nosso grupo de pesquisa (Lucena *e cols.*, 2007b) onde foi demonstrado um efeito antioxidante do EE da *C. paludosa* administrado cronicamente, por 14 dias, na dose de 100 mg/kg. A catalase e a Se-GPx são peroxidases responsáveis pela detoxificação de peróxidos endógenos. Entretanto, pouco se sabe sobre essa relação em regiões anatômicas específicas do cérebro.

O EtOH atinge todos os tecidos do organismo e afeta a maioria das funções vitais, por ser uma molécula pequena e solúvel tanto em meio aquoso como lipídico (Lieber, 1997). Ele causa uma redução nos níveis de catalase

(Jordão Júnior *e cols.*, 1998) e Se-GPx (Boyer e Petersen, 1990) e aumento na formação de EROs (Ozel *e cols.*, 2010). A ingestão do EtOH também induz a um aumento na peroxidação lipídica (Jordão Júnior *e cols.*, 1998).

O presente estudo mostrou que os níveis de peroxidação lipídica dos animais do grupo do EtOH apresentaram-se elevados nos tecidos hipocampal e cerebelar, comparados aos animais do grupo controle, quando avaliados pelo método de TBARS e de alaranjado de xilenol, corroborando com dados da literatura (Jordão Júnior *e cols.*, 1998). Importante ressaltar que este efeito foi revertido pelo tratamento crônico com as três doses do EE da *C. paludosa*, sugerindo o potencial efeito antioxidante e protetor do extrato. Esse efeito se manteve presente no tecido de fígado avaliado pelos dois métodos. Assim, esses resultados explicam parte dos efeitos neuroprotetores da *C. paludosa*, observados nos ensaios comportamentais.

Analisando os dados em conjunto, a *C. paludosa* pode ser uma alternativa para o tratamento de disfunções neurocomportamentais. Estudos fitoquímicos estão em processo de identificação de compostos ativos presentes na planta que podem ser responsáveis por estas propriedades neuroprotetoras.

5. CONCLUSÕES PARCIAIS

Em conjunto, o presente estudo mostrou que a exposição ao EtOH durante o período gestacional e lactacional produz alterações comportamentais do tipo ansiogênicas e déficits cognitivos em proles adultas, bem como parâmetros oxidantes em tecidos cerebrais e de fígado. Esses dados favorecem os estudos clínicos mostrando que independente das alterações comportamentais, faz-se

necessário à intervenção no uso do álcool durante a gravidez objetivando a redução do risco da FAS. Além disso, os dados deste estudo sugerem que o EE da *C. paludosa* pode representar valiosa ferramenta para melhorar déficits emocionais e/ou cognitivos produzidos pela exposição prenatal ao EtOH. Estudos adicionais são necessários para determinar os mecanismos bioquímicos e/ou moleculares responsáveis por estas respostas.

CAPÍTULO 3

***Cipura paludosa x MeHg x
Estresse oxidativo***

EFEITOS DA *C. paludosa* EM RATOS ADULTOS EXPOSTOS AO MeHg DURANTE O PERÍODO GESTACIONAL

1. INTRODUÇÃO

1.1. Qual o interesse em se estudar o MeHg?

❖ A intoxicação pelo MeHg x Amazônia

A preocupação com a contaminação mercurial na Amazônia veio como um subproduto de uma das maiores “corridas do ouro” (*goldrush*) que já aconteceu. Nas últimas décadas do século XX, o Brasil tornou-se um dos maiores produtores de ouro, graças ao minério extraído da Amazônia. As estimativas conservadoras indicam que, pelo menos, 100 toneladas de ouro por ano são produzidas na Amazônia desde meados da década de oitenta, excedendo as 80 toneladas extraídas na Califórnia, no pico da corrida do ouro, em meados do século XIX.

O subproduto de todo este processo é o despejo concomitante na natureza de cerca de 100 a 200 toneladas de mercúrio por ano. Isto ocorre porque na Amazônia existe uma parcela da população que tem como atividade ocupacional o garimpo artesanal do ouro (Brown, 1990; Pinheiro e cols., 2008). A purificação do ouro é realizada pela queima do “azougue” que, muitas vezes, é realizada sem qualquer técnica mais elaborada ou cuidado com o meio ambiente. Neste processo ocorre a volatilização do vapor de mercúrio que, além de ser inalado pelo garimpeiro que efetua a queima, pode contaminar o ambiente ao seu redor.

O mercúrio volatilizado, quando depositado em rios, lagos ou lagoas fica retido em sedimentos bênticos, onde sofre o processo de metilação por ação de

bactérias aeróbicas e anaeróbicas. Uma vez na água, o MeHg pode ser absorvido por organismos vivos, plantas aquáticas e peixes, entre eles os peixes carnívoros, que no final da cadeia alimentar servem de nutriente para o próprio homem, contaminando-o. O vapor de mercúrio, que se espalha em ambiente terrestre, pode também ser metilado, o que favorece sua absorção pelas plantas e animais, ampliando a cadeia de contaminação (Figura 9) (Brown, 1990).

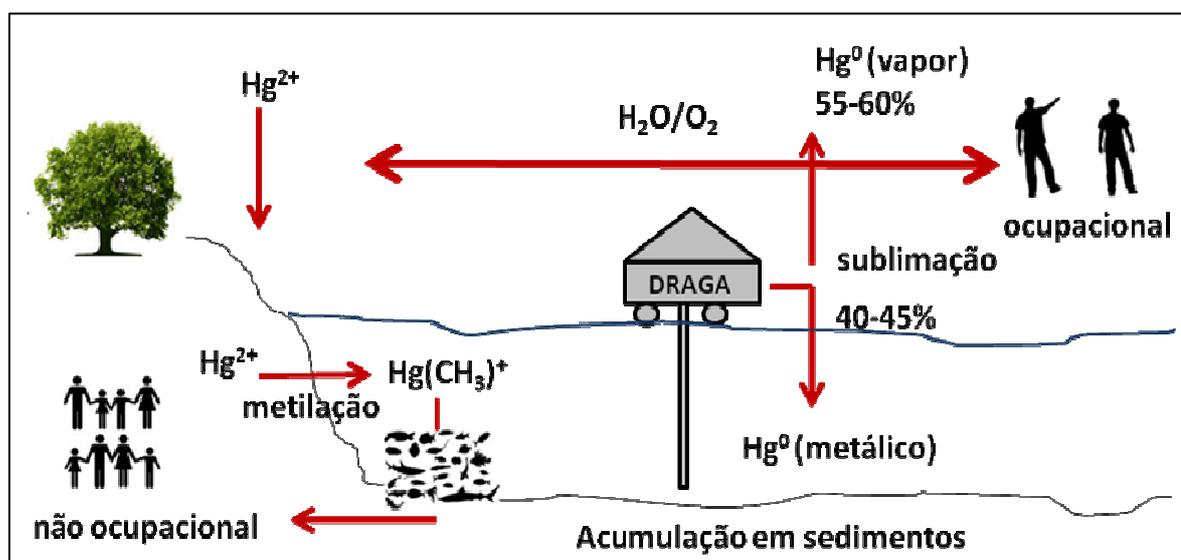


Figura 9: Figura esquemática do ciclo do mercúrio. As emissões atmosféricas de mercúrio elementar (Hg^0) ocorrem através de eventos naturais ou através de atividades antropogênicas. O vapor de mercúrio, presente no ar atmosférico, pode sofrer oxidação, transformando-se em mercúrio inorgânico (Hg^{2+}), que é depositado no solo ou rios e lagos. Nos sistemas aquáticos, o Hg^{2+} pode sofrer metilação, transformando-se em metilmercúrio (MeHg) e depositar-se nos plânctons, que são fonte alimentar dos animais marinhos. Desta forma, o consumo de peixes contaminados pelo MeHg pode ser fonte de contaminação dos seres humanos. Fonte: Maia, 2009, adaptado de Lacerda e cols., 1987.

Duas formas de intoxicação mercurial são relevantes neste caso, sendo que na primeira existe a exposição direta ao vapor de mercúrio metálico pelo garimpeiro, durante a “queima do ouro”. A exposição crônica, com absorção de pequenas quantidades em períodos prolongados de tempo, dependendo da dose, do tempo de exposição, da susceptibilidade individual, e do tipo de composto mercurial ao qual o indivíduo estará exposto, pode levar a vários sintomas, entre eles os problemas nervosos (Beeson e McDermott, 1977; Brito Filho, 1988).

A poluição do meio ambiente pelo mercúrio, oriunda das atividades de garimpo, leva ao aparecimento de formas orgânicas desse elemento, como o MeHg, as quais, quando ingeridas por meio de alimentos contaminados, produzem uma outra síndrome clínica conhecida como síndrome de Hunter-Russel ou doença de Minamata (Hunter e Russell, 1954).

Uma série de estudos, realizada a partir da década de oitenta, documentaram este tipo de ameaça à saúde individual e coletiva das pessoas que vivem em vários locais da Amazônia (Brown, 1990; Palheta, 1993; Pinheiro e cols., 2008; Santos e cols., 2000). Diversos estudos mostraram, por exemplo, que as amostras de peixes coletadas na região de Itaituba, Rio Tapajós, tinham concentração de mercúrio total superior ao limite de referência da Organização Mundial da Saúde (OMS) (0,5 ppm). Como o consumo de peixe pela comunidade local chega à cerca de 200 g/dia, a possibilidade de ingestão de uma quantidade proibitiva de mercúrio é elevada (Akagi e cols., 1995, 1996; Rodrigues e cols., 1994).

❖ MeHg x estresse oxidativo

Os metais agem como catalisadores em reações oxidativas de macromoléculas biológicas, e, portanto, sua toxicidade poderia estar relacionada ao dano oxidativo dos tecidos (Ercal e cols., 2001). O mercúrio produz depleção dos principais antioxidantes celulares, principalmente os que contêm grupos tiólicos. Ele pode aumentar a geração de EROs, como os radicais OH^\bullet e $\text{O}_2^{\bullet-}$ e o H_2O_2 . A maior produção de oxigênio reativo pode destruir as defesas antioxidantes intrínsecas das células e resultar na condição de estresse oxidativo.

A maior fração do MeHg ingerida é excretada na urina (10%) e fezes (90%) como um complexo glutathione-MeHg (Norseth e Clarkson, 1970; Rowland *e cols.*, 1980) e 16% do mercúrio excretado no leite materno está na forma de MeHg (Counter e Buchanan, 2004). Uma parte dele, presente na bile, pode sofrer recirculação hepato-biliar, prolongando a sua meia-vida biológica (alcançando dois meses) no organismo, o que é dependente da dose de contaminação (Counter e Buchanan, 2004; Dutczak *e cols.*, 1991).

Além disso, o MeHg é transportado pelos eritrócitos (90%), com uma pequena fração ligada às proteínas do plasma. Por ser lipossolúvel, atravessa facilmente a barreira hematoencefálica e placentária, acumulando-se no embrião e interferindo no seu desenvolvimento (Counter e Buchanan, 2004; Lackowicz e Anderson, 1980). Evidências relacionadas a estes aspectos têm suporte nas consequências dos desastres ocorridos em Minamata e Niigata (Japão) causadas pelo consumo de peixes contaminados por MeHg (Bertossi *e cols.*, 2004), e no Iraque e em Seychelles (Huang *e cols.*, 2005). Nesses locais verificou-se que houve contaminação de embriões por esse contaminante, por meio da via placentária.

Vários estudos mostraram que as vítimas, citadas acima, apresentaram sintomas semelhantes à paralisia cerebral caracterizada por grave deficiência mental, disfunções motoras e convulsões (Bertossi *e cols.*, 2004; Davidson *e cols.*, 2004). O exame histopatológico dos casos ocorridos no Japão revelou destruição neuronal generalizada do SNC (Matsumoto *e cols.*, 1964; Takeuchi e Eto, 1999). Nos casos ocorridos no Iraque, observou-se um arranjo anormal dos neurônios no cérebro e no cerebelo (Choi *e cols.*, 1978; Choi, 1989).

No que diz respeito ao mecanismo de ação do MeHg, tem sido relatado que esse elemento é capaz de alterar, de forma consistente, a homeostase intracelular do Ca^{++} em vários tipos celulares (Hare e Atchison, 1992; Marty e Atchison, 1997). A morte de células da camada granulosa do cerebelo, induzida pelo MeHg, tem sido associada ao crescente e severo influxo de Ca^{++} intracelular por alterações da homeostase do Ca^{++} , conforme resultados de estudos *in vitro* (Marty e Atchison, 1997).

Neste sentido, é que tem sido observado que o MeHg causa um aumento bifásico característico de Ca^{++} intracelular a partir de duas etapas: uma "primeira-fase" em que ocorre a liberação inicial de Ca^{++} intracelular de uma ou mais organelas citoplasmáticas, e por uma "segunda-fase" relacionada ao influxo secundário de Ca^{++} extracelular (Hare e Atchison, 1992; Marty e Atchison, 1997; Limke *e cols.*, 2003).

Essas evidências sugerem que as mitocôndrias contribuem, significativamente, para ambas as fases, onde na primeira fase ocorre o aumento de Ca^{++} intracelular e a morte subsequente da célula, em decorrência da abertura dos canais de transição de permeabilidade mitocondrial (CTPM), ainda não totalmente elucidado (Limke *e cols.*, 2003).

Ainda assim, dois mecanismos têm sido sugeridos para explicar a ação do MeHg nestes CTPM. Em primeira instância, esta ação pode ser meio da sua interação direta com proteínas mitocondriais, que alterariam a habilidade das mitocôndrias de funcionar normalmente, onde ele interferiria no transporte da corrente de elétrons por meio da interação direta nas proteínas respiratórias (Sone *e cols.*, 1977), induzindo a perda do potencial de membrana interno da

mitocôndria isoladamente (despolarização da membrana) (Bondy e Mckee, 1991), e gerando a abertura dos CTPM.

No que diz respeito ao segundo mecanismo relacionado à inibição indireta da função mitocondrial por meio do excessivo influxo de Ca^{++} para dentro das mitocôndrias, onde esta elevação promoveria também a despolarização da membrana mitocondrial interna (Loew e cols., 1994), inibiria o ciclo do ácido tricarboxílico e da ATPase mitocondrial (Gunter e Gunter, 1994; Simpson e Russell, 1998), e promoveria a abertura de mais CTPM (Petronilli e cols., 1993; Limke e cols., 2003)

Constatou-se que o MeHg inibe a atividade da glutathiona peroxidase (GPx) no sangue (Meydani e cols., 1984) de rato, da glutathiona redutase em eritócitos de rato e do glutathiona glicósido, após experimentos realizados *in vitro* e *in vivo* (Choi e cols., 1996; Mikkanem e Ganther, 1974). Além disso, estudos têm mostrado que a exposição de ratos ao MeHg produz inibição da glutathiona cerebral (Lucena e cols., 2007b; Lucena e cols., 2010a; Pekkanem e Sandholm, 1972).

Outro interesse em investigar o MeHg é o aspecto ambiental e saúde na Amazônia. Os estudos realizados, até hoje, permitiram que as autoridades de saúde definissem um quadro clínico característico da doença de Minamata, quando esta se encontra em estado avançado de comprometimento neurológico.

Existe ainda uma considerável incerteza sobre os sintomas apresentados pelos pacientes nos primeiros estágios da doença, sobre os melhores métodos de diagnóstico precoce, sobre a correlação entre nível de mercúrio ingerido e o aparecimento dos diversos sintomas e quais os mecanismos neuropatológicos

pelos quais o mercúrio interfere nas células do organismo humano, inclusive nos neurônios centrais e periféricos.

Estas perguntas são centrais ao problema da poluição ambiental pelo mercúrio e saúde humana na Amazônia. Essa situação justifica a investigação de compostos que possam atenuar ou reverter os quadros degenerativos, com a utilização de produtos naturais da própria Amazônia, baseado em modelos experimentais de neurodegeneração e neuroproteção.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Animais e Tratamento

Os procedimentos quanto ao cruzamento dos animais e detecção das ratas grávidas já foram previamente descritos na página 53. Para o tratamento das grávidas, um grupo de 20 animais recebeu água de torneira e outro grupo de 20 animais recebeu MeHg (8 mg/kg), no décimo quinto dia de gestação. Este período é um estágio de desenvolvimento em que a zona ventricular cerebral do feto produz neurônios no córtex cerebral embrionário (DiCicco-Bloom e Sondell, 2005).

As soluções foram administradas por via oral, em volumes de 1 mL/kg de peso corpóreo total. A dose para o tratamento com MeHg foi baseada na literatura e em resultados pilotos realizados em nosso laboratório (Cagiano *e cols.*, 1990; Maia *e cols.*, 2009; Zanolli *e cols.*, 1994) os quais demonstraram déficits comportamentais em ratos adultos expostos ao MeHg durante o desenvolvimento fetal. Portanto, o esquema de tratamento atual com o MeHg representa um modelo para o estudo de déficits comportamentais de longa duração de intoxicação aguda, durante a gravidez.

Após o nascimento, as proles foram mantidas com a mãe até o 21º dia (desmame), sendo estas separadas por sexo e grupo experimental controle (C) e MeHg. Ao atingirem dois meses de idade, as proles foram separadas em subgrupos de animais para receberem tratamento crônico, por gavagem, por 14 dias que antecederam os testes comportamentais. O tratamento com o EE da *C. paludosa* ou veículo (salina) foi realizado nas proles machos e nas doses de 1, 10 ou 100 mg/kg, com n=10 animais por grupo. As proles fêmeas foram utilizadas em outros projetos. O interesse em se investigar estas três doses do EE da *C. paludosa* já foi mencionada na página 54.

2.2. Testes comportamentais

As metodologias empregadas nos testes comportamentais foram descritas previamente no primeiro capítulo, nas páginas 18 a 25.

2.3. Testes bioquímicos

2.3.1. Preparação dos tecidos

Para a preparação dos tecidos seguiu-se a mesma metodologia previamente descrita no segundo capítulo, presente nas páginas 54-55.

2.3.2. Determinação das atividades enzimáticas

- Preparo dos extratos proteicos

A metodologia empregada para o preparo dos extratos proteicos foi previamente descrita no segundo capítulo, na página 55.

- **Atividade de enzimas antioxidantes**

A metodologia empregada nos ensaios de atividade de enzimas antioxidantes foi descrita, previamente, no segundo capítulo que compreendem os testes para medir a atividade da catalase (páginas 55-56) e da Se-GPx (páginas 56-57).

2.3.3. Concentração de proteína

Para a medição da concentração protéica dos tecidos seguiu-se a mesma metodologia descrita no segundo capítulo presente na página 58.

2.3.4. Indicadores de danos oxidativos

As metodologias empregadas nos ensaios de indicadores oxidativos foram descritas previamente no segundo capítulo que compreendem os testes para medir a peroxidação lipídica pelo método de TBARS (páginas 58-60) e pelo método de alaranjado de xilenol (páginas 60-61).

2.4. Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas conforme descrito no primeiro capítulo presente nas páginas 26-27.

3. RESULTADOS

3.1. Teste da Atividade locomotora espontânea

Os efeitos do tratamento crônico da administração oral do EE da *C. paludosa* (1, 10 ou 100 mg/kg), veículo (V: 10 mL/kg), DZP (1 mg/kg, controle positivo para o teste do LCE), FXT (10 mg/kg, controle positivo para o teste do nado forçado) ou cafeína (CAF: 10 mg/kg, controle positivo para os testes de memória) em ratos avaliados no teste do campo aberto estão no gráfico 24.

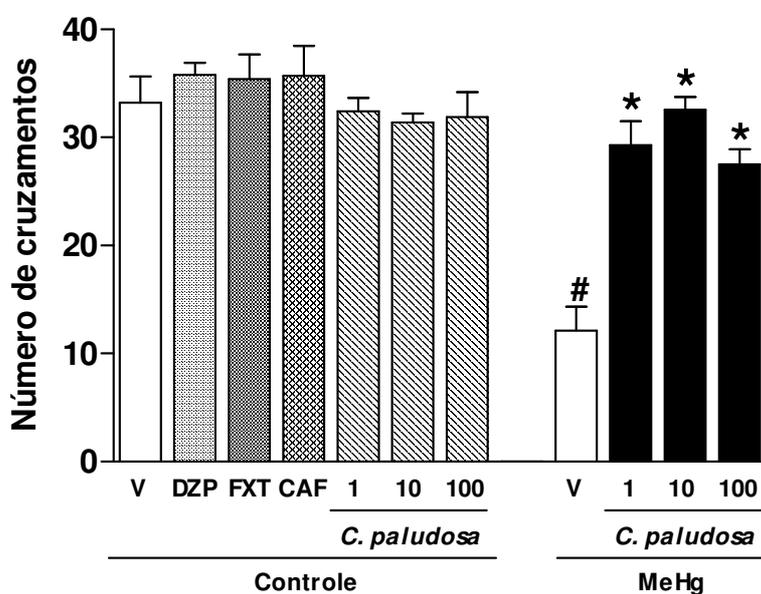


Gráfico 24: Efeito da administração crônica do EE da *C. paludosa* (1, 10 ou 100 mg/kg, v.o.) ou veículo (V) na atividade locomotora de proles adultas de ratas expostas ao MeHg durante o período gestacional, avaliadas no teste do campo aberto, durante 5 min. DZP (1 mg/Kg), FXT (10 mg/Kg) ou CAF (10 mg/kg) foram utilizados como controles positivos. Os resultados são expressos como a média \pm E.P.M. de 10 animais por grupo. * $p < 0,05$ difere significativamente quando comparado ao tratamento com veículo do mesmo grupo. # $p < 0,05$ difere significativamente quando comparado ao tratamento com veículo do grupo controle (Teste de Newman-Keuls). DZP=diazepam, FXT=fluoxetina, CAF=cafeína.

A ANOVA de uma via revelou diferença significativa entre os grupos, quando comparados ao grupo controle tratado com veículo ($F_{(7,79)} = 14,75$, $p < 0,0001$). O teste de Newman-Keuls indicou uma redução significativa na

atividade locomotora em ratos adultos expostos prenatalmente ao MeHg. O tratamento crônico com o EE da *C. paludosa* (1, 10 ou 100 mg/kg, v.o.) produziu um aumento na atividade locomotora, indicando que o tratamento crônico com o EE foi capaz de reverter o déficit locomotor associado com a exposição prenatal ao MeHg.

3.2. Teste do LCE

Os efeitos do tratamento crônico da administração oral do EE da *C. paludosa* (1, 10 ou 100 mg/kg), veículo (10 mL/kg) ou DZP (1 mg/kg, controle positivo), em proles adultas de ratas expostas ao MeHg durante o período gestacional, avaliadas no teste do LCE, estão presentes no gráfico 25 A-C. ANOVA de uma via revelou efeitos significantes para os fatores de tratamento na %EBA ($F_{(8,89)} = 10,43$; $p \leq 0,0001$) (Gráfico 25 A), na %TBA ($F_{(8,89)} = 15,06$; $p \leq 0,0001$) (Gráfico 25 B), mas não significante para o número de EBF ($F_{(8,89)} = 1,92$; $p = 0,068$) (Gráfico 25 C).

O teste de Newman-Keuls revelou uma redução significante na %EBA (Gráfico 25 A) e na %TBA (Gráfico 25 B), sem alterar o número de EBF (Gráfico 25 C) nas proles adultas expostas prenatalmente ao MeHg, quando comparadas ao grupo controle. Além disso, a administração crônica com o EE da *C. paludosa* (1, 10 ou 100 mg/kg) produziu um aumento na %EBA durante o teste do LCE (Figura 33 A) e a dose de 100 mg/kg um aumento na %TBA (Gráfico 25 B). Esses dados indicam que o tratamento com o extrato da *C. paludosa* foi capaz de reduzir o comportamento do tipo ansiogênico produzido pela exposição prenatal ao MeHg em proles adultas.

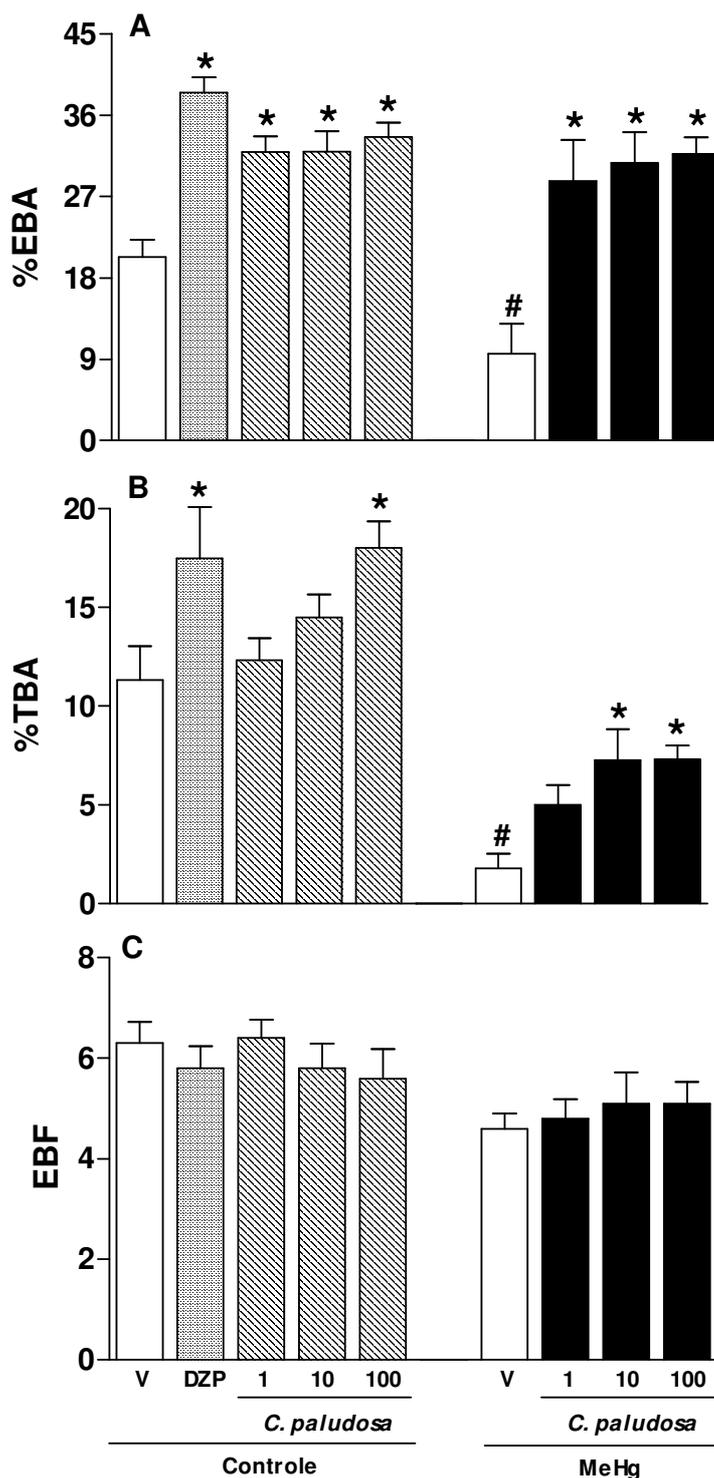


Gráfico 25: Efeito da administração crônica do EE da *C. paludosa* (1, 10 ou 100 mg/kg, v.o.) ou veículo (V) na percentagem de entradas nos braços abertos (%EBA) (A), na percentagem do tempo nos braços abertos (%TBA) (B) e no número de EBF (C) em proles adultas de ratas expostas ao MeHg durante o período gestacional avaliadas no teste do LCE, durante 5 min. DZP (1 mg/Kg, v.o.) foi utilizado como controle positivo. Os resultados são expressos como a média ± E.P.M. de 10 animais por grupo. * $p < 0,05$ difere significativamente quando comparado ao tratamento com veículo do mesmo grupo. # $p < 0,05$ difere significativamente quando comparado ao tratamento com veículo do grupo controle. (Teste de Newman-Keuls). DZP=diazepam.

3.3. Teste do nado forçado

Os efeitos do tratamento crônico da administração oral do EE da *C. paludosa* (1, 10 ou 100 mg/kg), veículo (10 mL/kg) ou FXT (10 mg/kg, controle positivo), em proles adultas de ratas expostas ao MeHg, durante o período gestacional, avaliadas no teste do nado forçado estão demonstrados no gráfico 26 A-C. ANOVA de uma via revelou efeitos significantes para os fatores de tratamento no tempo de subida ($F_{(8,89)} = 14,53$; $p \leq 0,0001$) (Gráfico 26 A), no tempo de nado ($F_{(8,89)} = 25,18$; $p \leq 0,0001$) (Gráfico 26 B), e no tempo de imobilidade ($F_{(8,89)} = 42,30$; $p \leq 0,0001$) (Gráfico 26 C).

O teste de Newman-Keuls revelou que as proles adultas de ratos nascidas de mães expostas ao MeHg, durante o período gestacional, apresentaram comportamento do tipo depressivo, sugerido por uma redução significativa nos tempos de subida e nado e por um aumento no tempo de imobilidade durante o teste do nado forçado. Entretanto, o tratamento crônico com o EE da *C. paludosa* apresentou um comportamento do tipo antidepressivo comparado ao grupo controle, resultando no aumento do tempo de subida (Gráfico 26 A) e uma redução significativa no tempo de imobilidade (Gráfico 26 C), no teste do nado forçado.

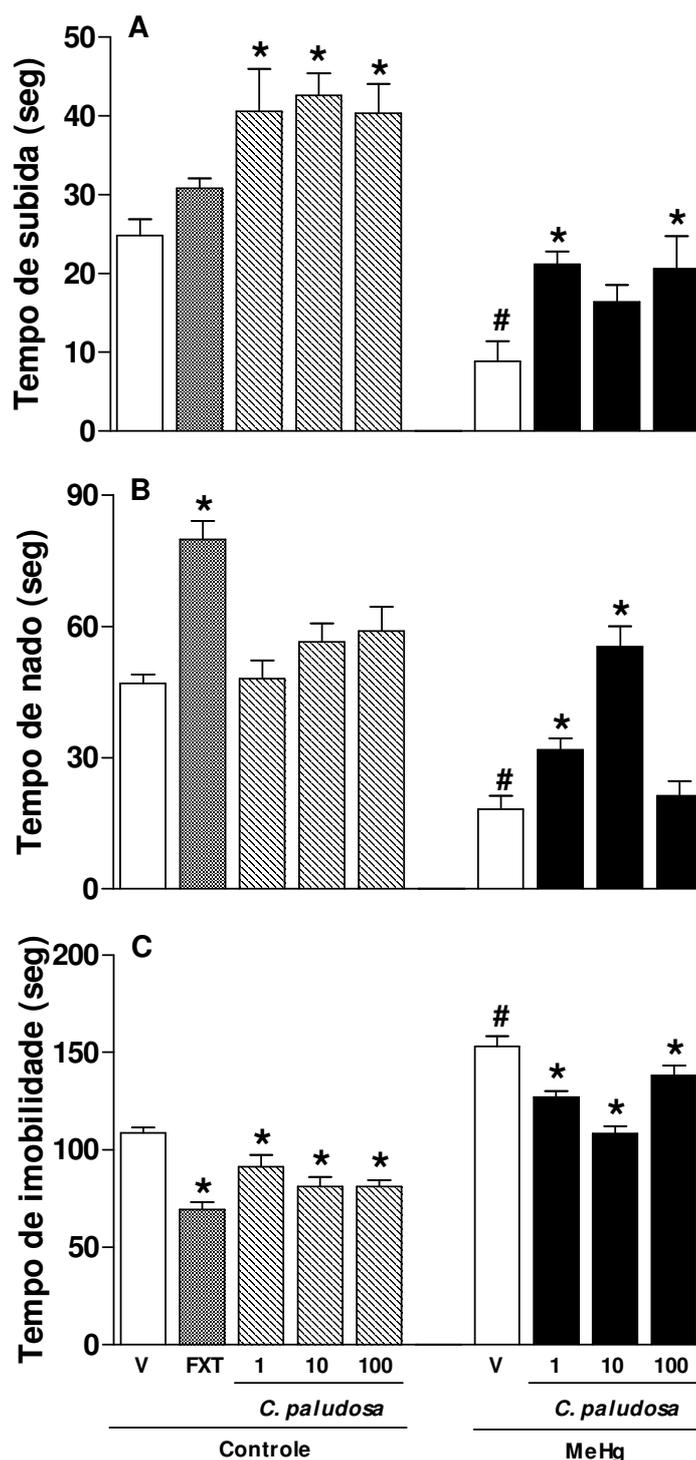


Gráfico 26: Efeito da administração crônica do EE da *C. paludosa* (1, 10 ou 100 mg/kg, v.o.) ou veículo (V) no tempo de subida (A), no tempo de nado (B) e no tempo de imobilidade (C) de proles adultas de ratas expostas ao MeHg durante o período gestacional, avaliadas no teste do nado forçado, durante 3 min. FXT (10 mg/Kg, v.o.) foi utilizado como controle positivo. Os resultados são expressos como a média \pm E.P.M. de 10 animais por grupo. * $p < 0,05$ difere significativamente quando comparado ao tratamento com veículo do mesmo grupo. # $p < 0,05$ difere significativamente quando comparado ao tratamento com veículo do grupo controle (Teste de Newman-Keuls). FXT=fluoxetina.

3.4. Testes de memória

- Reconhecimento social

O gráfico 27 mostra os resultados do tratamento crônico da administração oral do EE da *C. paludosa* (1, 10 ou 100 mg/kg), veículo (10 mL/kg) ou CAF (10 mg/kg, v.o., controle positivo) em proles adultas de ratas expostas ao MeHg, durante o período gestacional, na memória de reconhecimento social de ratos quando o mesmo rato jovem foi re-exposto depois de um período de 30 min da primeira exposição. ANOVA de uma via revelou um efeito significativo para o tratamento com o EE ($F_{(17,179)}=24,69$; $p<0,0001$) no tempo de investigação durante a segunda apresentação do mesmo rato jovem (Gráfico 27).

O teste de Newman-Keuls mostrou que, nesse tempo, os ratos tratados com CAF ou com o EE da *C. paludosa* (1, 10 ou 100 mg/kg) apresentaram uma redução significativa no tempo de investigação durante a segunda apresentação do rato jovem familiar, sugerindo um efeito facilitador da memória social (Gráfico 27). Entretanto, os animais do grupo do MeHg apresentaram um significativo déficit cognitivo na memória social, não sendo capazes de reconhecer o animal jovem durante a segunda apresentação, sendo este efeito revertido pelo tratamento com o EE nas doses de 10 e 100 mg/kg.

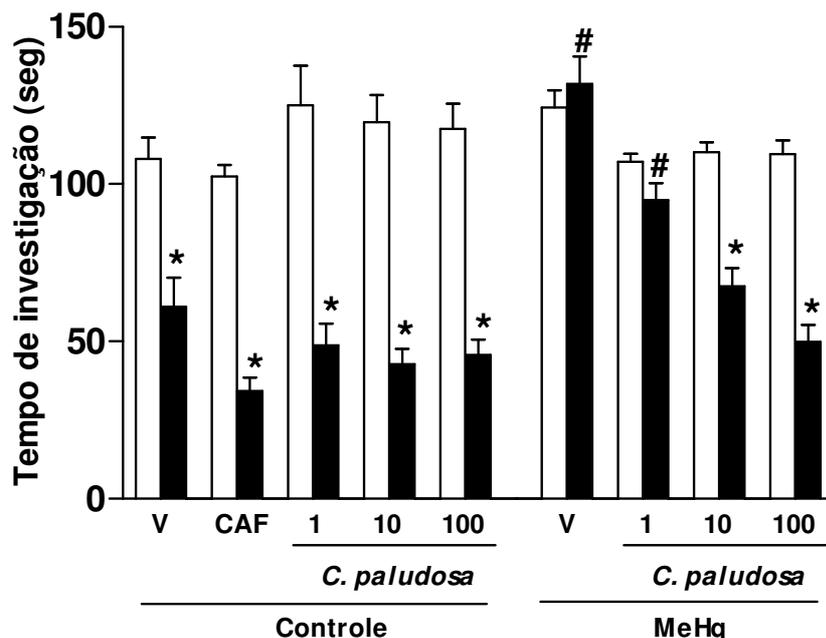


Gráfico 27: Efeito da administração crônica do EE da *C. paludosa* (1, 10 ou 100 mg/kg, v.o.), veículo (V) ou CAF (10 mg/kg, controle positivo, v.o.) no tempo de investigação social de ratos adultos expostos ao MeHg, durante o período gestacional, quando o mesmo rato jovem foi re-exposto ao rato adulto, após um intervalo de 30 min da primeira apresentação. Os resultados são expressos como a média \pm E.P.M. de 10 animais por grupo. As barras representam o tempo de investigação na primeira (barras brancas) e segunda (barras pretas) apresentação. * $p < 0,05$ difere significativamente quando comparado à primeira apresentação do mesmo grupo. # $p < 0,05$ difere significativamente quando comparado à segunda apresentação do grupo controle tratado com o veículo (Teste de Newman-Keuls). CAF=caféina

O gráfico 28 mostra os resultados do tratamento crônico da administração oral do EE da *C. paludosa* (1, 10 ou 100 mg/kg), veículo (10 mL/kg) ou CAF (10 mg/kg, v.o., controle positivo), em proles adultas de ratas expostas ao MeHg durante o período gestacional, na memória de reconhecimento social de ratos, após de um período de 120 min. A ANOVA de uma via revelou um efeito significativo para o tratamento com o EE ($F_{(17,179)}=13,25$; $p < 0,0001$) no tempo de investigação durante a segunda apresentação do mesmo rato jovem familiar (Gráfico 28 A). Em contrapartida, os animais do grupo do MeHg e veículo não foram capazes de reconhecer o animal jovem durante a segunda apresentação (após 120 min da primeira exposição).

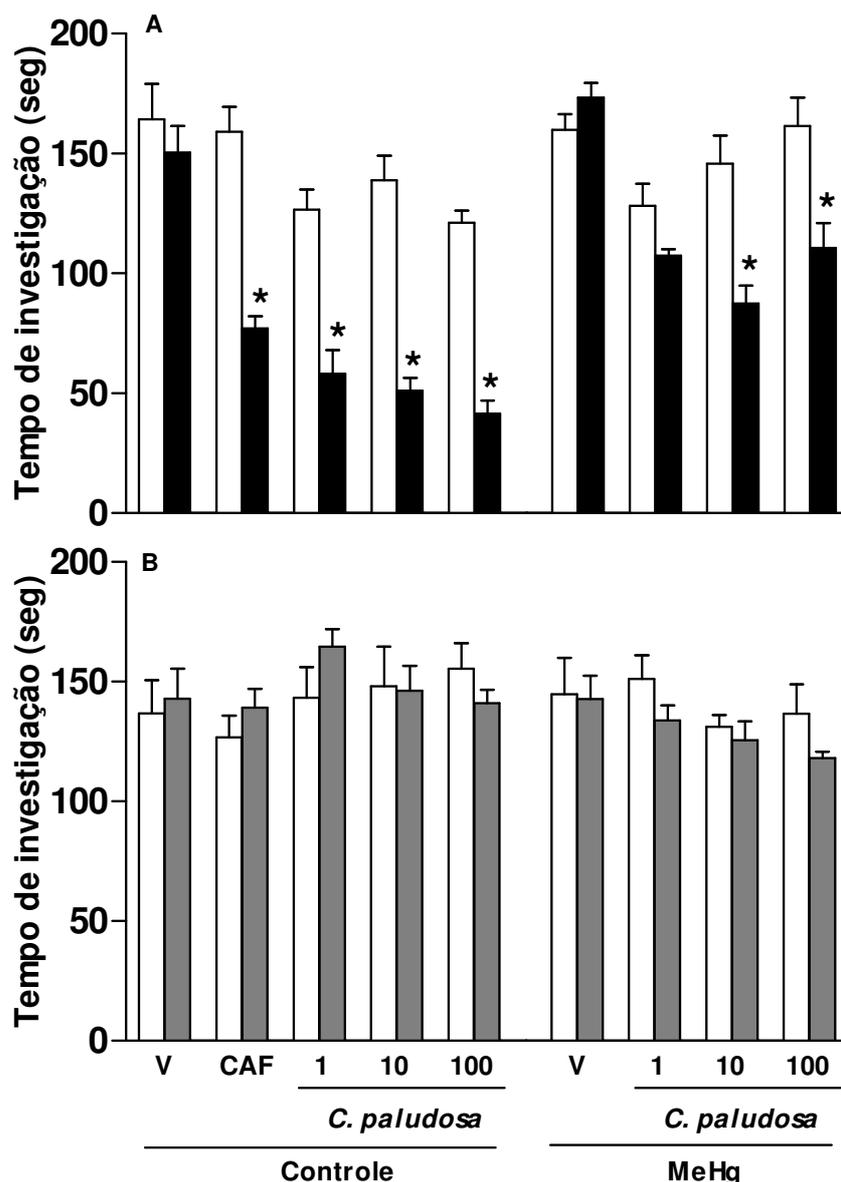


Gráfico 28: Efeito da administração crônica do EE da *C. paludosa* (1, 10 ou 100 mg/kg, v.o.), veículo (V) ou CAF (10 mg/kg, controle positivo, v.o.) no tempo de investigação social de ratos adultos expostos ao MeHg durante o período gestacional, quando o mesmo rato jovem (A) ou um rato jovem diferente (B) foi re-exposto ao rato adulto, após um intervalo de 120 min da primeira apresentação. Os resultados são expressos como a média \pm E.P.M. de 10 animais por grupo. As barras representam o tempo de investigação na primeira (barras brancas) e segunda (barras pretas ou cinzas) apresentação. * $p < 0,05$ difere significativamente quando comparado à primeira apresentação do mesmo grupo. # $p < 0,05$ difere significativamente quando comparado à segunda apresentação do grupo controle tratado com o veículo (Teste de Newman-Keuls). CAF=cafeína.

O teste de Newman-Keuls mostrou que, nesse tempo, os ratos tratados com CAF ou com o EE da *C. paludosa* (1, 10 ou 100 mg/kg) apresentaram uma redução significativa no tempo de investigação durante a segunda apresentação do rato jovem familiar, sugerindo um efeito facilitador da memória social (Gráfico

28 A). Por outro lado, os resultados com o extrato da *C. paludosa* parecem ser específicos sobre a memória social de ratos adultos, uma vez que a redução no tempo de investigação não foi observada quando um rato jovem, diferente daquele utilizado durante o primeiro encontro, foi apresentado na segunda exposição (Gráfico 28 B).

- **Esquiva inibitória do tipo “step-down”**

Os resultados do tratamento crônico da administração oral do EE da *C. paludosa* (1, 10 ou 100 mg/kg), veículo (10 mL/kg) ou CAF (10 mg/kg, v.o., controle positivo) em proles adultas de ratas expostas ao MeHg durante o período gestacional, na memória espacial de curta e longa duração, de ratos avaliados no teste da esquiva inibitória do tipo “step-down”, estão demonstrados na gráfico 29. O teste não paramétrico de Kruskal-Wallis revelou um efeito significativo para o tratamento na latência dos animais na memória de curta ($H(8, N=18)=154,6$; $p<0,0001$) e longa duração ($H(8, N=18)=153,4$; $p<0,0001$).

O teste de Mann-Whitney indicou que o tratamento com o EE da *C. paludosa* (1, 10 ou 100 mg/kg) e CAF (10 mg/kg), 60 min antes da sessão treino aumentou a latência dos animais na MCD e MLD, melhorando a memória espacial destes animais quando comparados aos animais controles tratados com o veículo (Gráfico 29). Além disso, o teste mostrou que os animais do grupo MeHg apresentaram déficit cognitivos quando comparados aos animais tratados com o veículo do grupo controle. Este efeito foi revertido pelo tratamento com o EE da *C. paludosa* nas doses de 10 e 100 mg/kg.

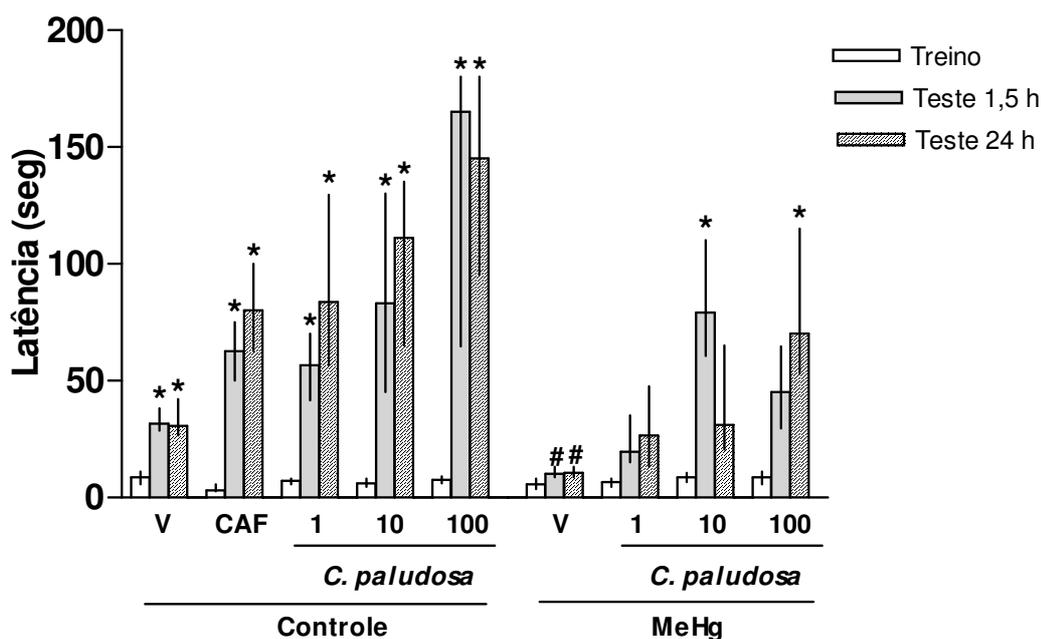


Gráfico 29: Efeito da administração crônica do EE da *C. paludosa* (1, 10 ou 100 mg/kg, v.o.), veículo (V) ou CAF (10 mg/kg, controle positivo, v.o.) na retenção da memória de curta (1,5 h) e longa (24 h) duração de ratos adultos expostos ao MeHg durante o período gestacional, avaliados no teste da esquiwa inibitória do tipo “step-down” (n=10 por grupo). Os dados estão expressos como as medianas (intervalo enterquartis) das latências de descida da plataforma nas sessões treino (barras brancas) e teste (1,5 h: barras cinzas; 24 h: barras hachuradas). * $p < 0,05$ difere significativamente quando comparado à respectiva sessão do grupo controle. # $p < 0,05$ difere significativamente quando comparado à respectiva sessão do grupo tratado (Teste de Mann-Whitney). CAF=cafeína.

3.5. Testes bioquímicos

3.5.1. Atividade de enzimas antioxidantes

- Catalase

O gráfico 30 mostra os resultados da atividade da catalase nos tecidos cerebrais em proles adultas de ratas expostas ao MeHg durante o período gestacional, bem como o tratamento crônico da administração oral do EE da *C. paludosa* (1, 10 ou 100 mg/kg) ou veículo (10 mL/kg). As análises estatísticas realizadas pela ANOVA de uma via indicaram um efeito significativo para o tratamento nos tecidos cortical ($F_{(7,23)}=6,627$; $p=0,0009$) e hipocampal

($F_{(7,23)}=9,952$; $p<0,0001$), sem apresentar efeito significativo no tecido cerebelar ($F_{(7,23)}=2,347$; $p=0,0747$).

O teste de Newman-Keuls indicou que o EE da *C. paludosa* aumentou os níveis da atividade da catalase na dose de 100 mg/kg no tecido cortical e nas doses de 10 e 100 mg/kg no tecido hipocampal dos animais controles, sem alterar a atividade da enzima no tecido cerebelar (Gráfico 30 A, B e C), respectivamente. Além disso, o EE da *C. paludosa* (1, 10 e 100 mg/kg) aumentou os níveis da atividade da catalase no tecido cortical de ratos adultos expostos ao MeHg durante o período gestacional (Gráfico 30 A) e no tecido hipocampal na dose de 100 mg/kg (Gráfico 30 B).

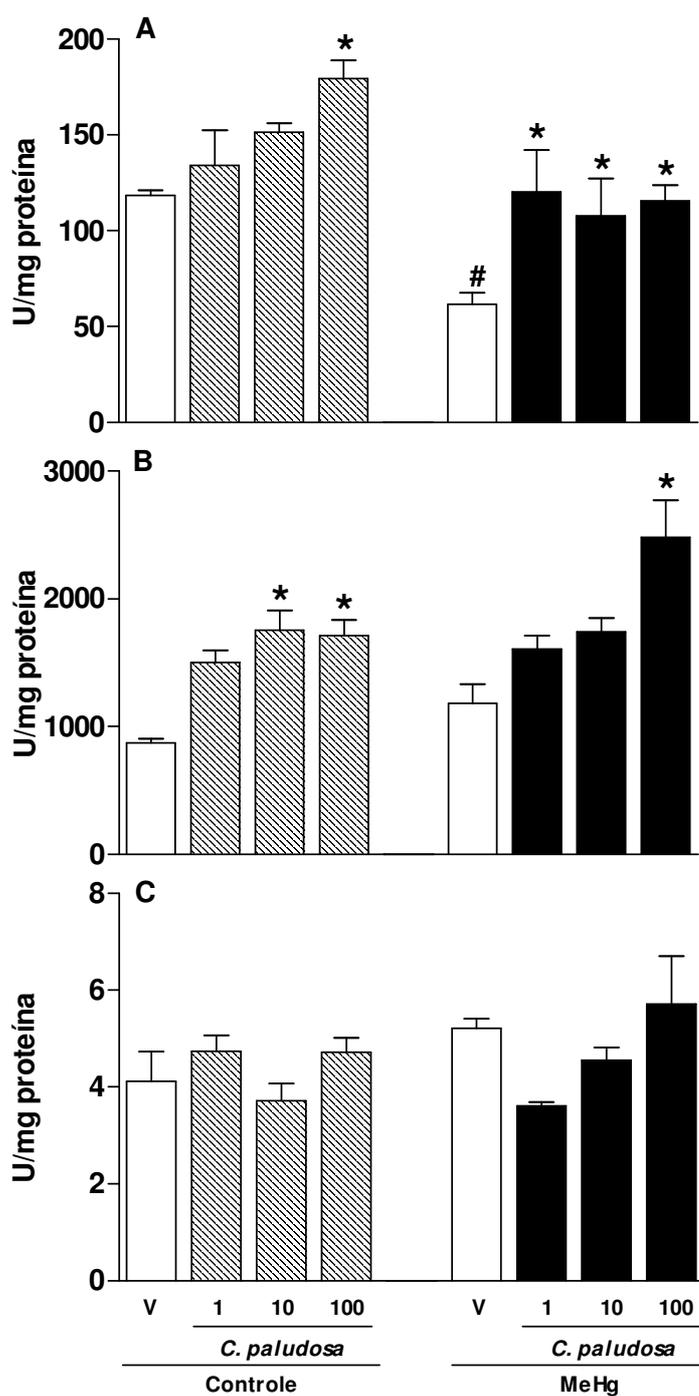


Gráfico 30: Efeito da administração crônica do EE da *C. paludosa* (1, 10 ou 100 mg/kg, v.o.) ou veículo (V) na atividade da catalase de tecidos cerebrais de proles adultas de ratas expostas ao MeHg durante o período gestacional. Os resultados são expressos como a média \pm E.P.M. de 3 animais por grupo dos níveis da atividade da catalase nos tecidos cortical (A), hipocampal (B) e cerebelar (C). * $p < 0,05$ difere significativamente quando comparado ao tratamento com veículo do mesmo grupo. # $p < 0,05$ difere significativamente quando comparado ao tratamento com veículo do grupo controle (Teste de Newman-Keuls).

O gráfico 31 mostra os resultados da atividade da catalase no tecido de fígado de proles adultas de ratas expostas ao MeHg durante o período gestacional, bem como o tratamento crônico da administração oral do EE da *C. paludosa* (1, 10 ou 100 mg/kg) ou veículo (10 mL/kg). A ANOVA de uma via indicou um efeito significativo para o tratamento ($F_{(7,23)}=7.992$; $p<0.0003$).

O teste de Newman-Keuls indicou que o EE da *C. paludosa* não aumentou a atividade da catalase nas doses de 1 e 10 mg/kg nos animais controles e nas três doses nos animais do grupo do MeHg. Além disso, o teste também apontou que o tratamento dos animais com o MeHg, durante o período gestacional, inibiu a atividade da catalase nas proles adultas.

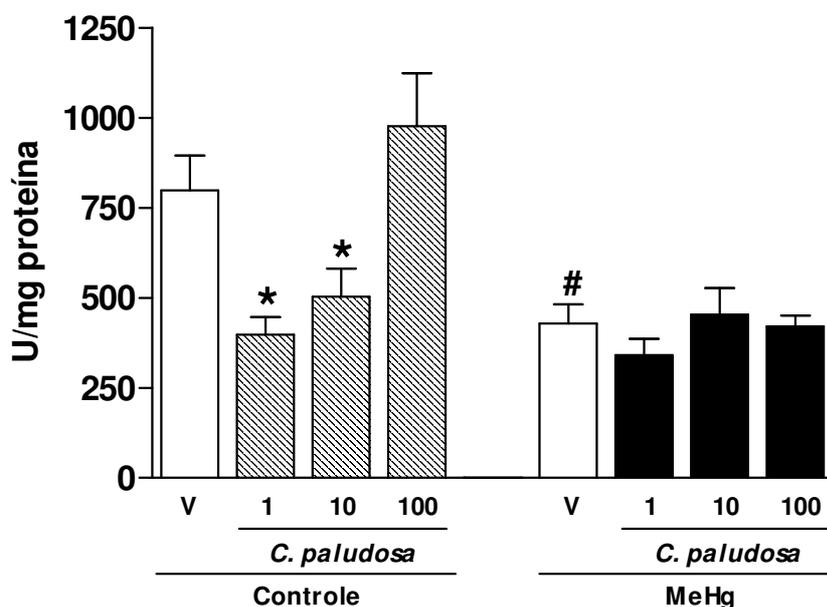


Gráfico 31: Efeito da administração crônica do EE da *C. paludosa* (1, 10 ou 100 mg/kg, v.o.) ou veículo (V) na atividade da catalase no tecido de fígado de proles adultas de ratas expostas ao MeHg durante o período gestacional. Os resultados são expressos como a média \pm E.P.M. de 3 animais por grupo. * $p<0,05$ difere significativamente quando comparado ao tratamento com veículo do mesmo grupo. # $p<0,05$ difere significativamente quando comparado ao tratamento com veículo do grupo controle (Teste de Newman-Keuls).

- **Glutathiona peroxidase dependente de selênio**

O gráfico 32 mostra os resultados da atividade da Se-GPx nos tecidos cerebrais em proles adultas de ratas expostas ao MeHg durante o período gestacional, bem como o tratamento crônico da administração oral do EE da *C. paludosa* (1, 10 ou 100 mg/kg) ou veículo (10 mL/kg). As análises estatísticas realizadas pela ANOVA de uma via indicaram um efeito significativo para o tratamento nos tecidos cortical ($F_{(7,23)}=7,701$; $p=0,0004$) e cerebelar ($F_{(7,23)}=18,72$; $p<0,0001$) sem alterar a atividade da enzima no tecido hipocampal (Gráfico 32 A, C e B), respectivamente.

O teste de Newman-Keuls indicou que o EE da *C. paludosa* nas três doses aumentou a atividade da Se-GPx no tecido cortical e cerebelar dos animais controles, sem alterar a atividade da enzima no tecido hipocampal (Gráfico 32 A, C e B), respectivamente. Esse mesmo efeito foi observado nas proles cujas mães foram expostas ao MeHg, onde o EE da *C. paludosa*, na dose de 10 mg/kg, aumentou a atividade da Se-GPx no tecido cortical (Gráfico 32 A) e nas três doses, no tecido cerebelar (Gráfico 32 C) onde a atividade da Se-GPx se mostrou reduzida quando comparado ao grupo tratado com o veículo dos animais controles.

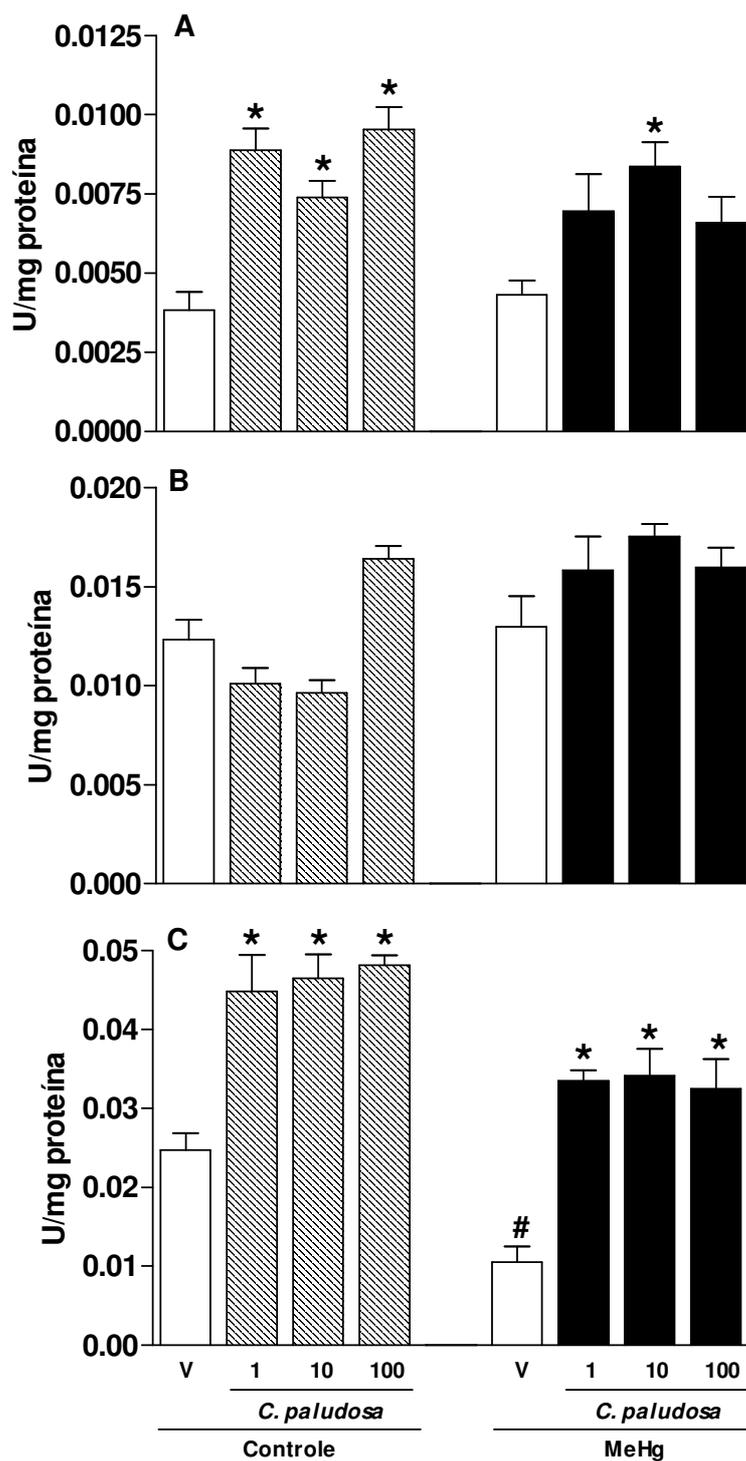


Gráfico 32: Efeito da administração crônica do EE da *C. paludosa* (1, 10 ou 100 mg/kg, v.o.) ou veículo (V) na atividade da glutatona peroxidase dependente de selênio em tecidos cerebrais de proles adultas de ratos expostas ao MeHg, durante o período gestacional. Os resultados são expressos como a média ± E.P.M. de 3 animais por grupo dos níveis da atividade da catalase nos tecidos cortical (A), hipocampal (B) e cerebelar (C). * $p < 0,05$ difere significativamente quando comparado ao tratamento com veículo do mesmo grupo. # $p < 0,05$ difere significativamente quando comparado ao tratamento com veículo do grupo controle (Teste de Newman-Keuls).

O gráfico 33 mostra os resultados da atividade da Se-GPx no tecido de fígado de proles adultas de ratas expostas ao MeHg durante o período gestacional, bem como o tratamento crônico da administração oral do EE da *C. paludosa* (1, 10 ou 100 mg/kg) ou veículo (10 mL/kg). A ANOVA de uma via não indicou qualquer efeito significativo para o tratamento ($F_{(7,23)}=1,435$; $p=0,2590$).

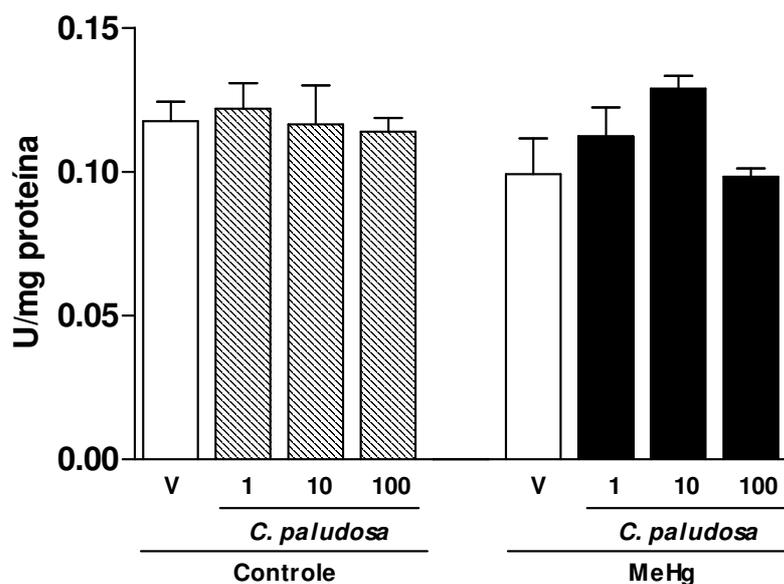


Gráfico 33: Efeito da administração crônica do EE da *C. paludosa* (1, 10 ou 100 mg/kg, v.o.) ou veículo (V) na atividade da glutatona peroxidase dependente de selênio no tecido de fígado de proles adultas de ratas expostas ao MeHg durante o período gestacional. Os resultados são expressos como a média \pm E.P.M. de 3 animais por grupo.

3.5.2. Indicadores de danos oxidativos

- Peroxidação lipídica pelo método de TBARS

O gráfico 34 mostra os resultados dos níveis de TBARS nos tecidos cerebrais de proles adultas de ratas expostas ao MeHg durante o período gestacional, bem como o tratamento crônico da administração oral do EE da *C. paludosa* (1, 10 ou 100 mg/kg) ou veículo (10 mL/kg). As análises estatísticas realizadas pela ANOVA de uma via indicou um efeito significante apenas para o

tratamento no tecido cerebelar ($F_{(7,23)}=25,70$; $p<0,0001$) (Gráfico 34 C), sem alterar os níveis de TBARS no tecido cortical ($F_{(7,23)}=0,5428$; $p=0,7900$) (Gráfico 34 A) e no tecido hipocampal ($F_{(7,23)}=0,3225$; $p=0,9327$) (Gráfico 34 B).

O teste de Newman-Keuls indicou que o tratamento com o MeHg aumentou os níveis de TBARS no tecido (Gráfico 34 C) e que esse efeito de peroxidação lipídica foi revertido pelo tratamento dos animais com as três doses do EE da *C. paludosa*.

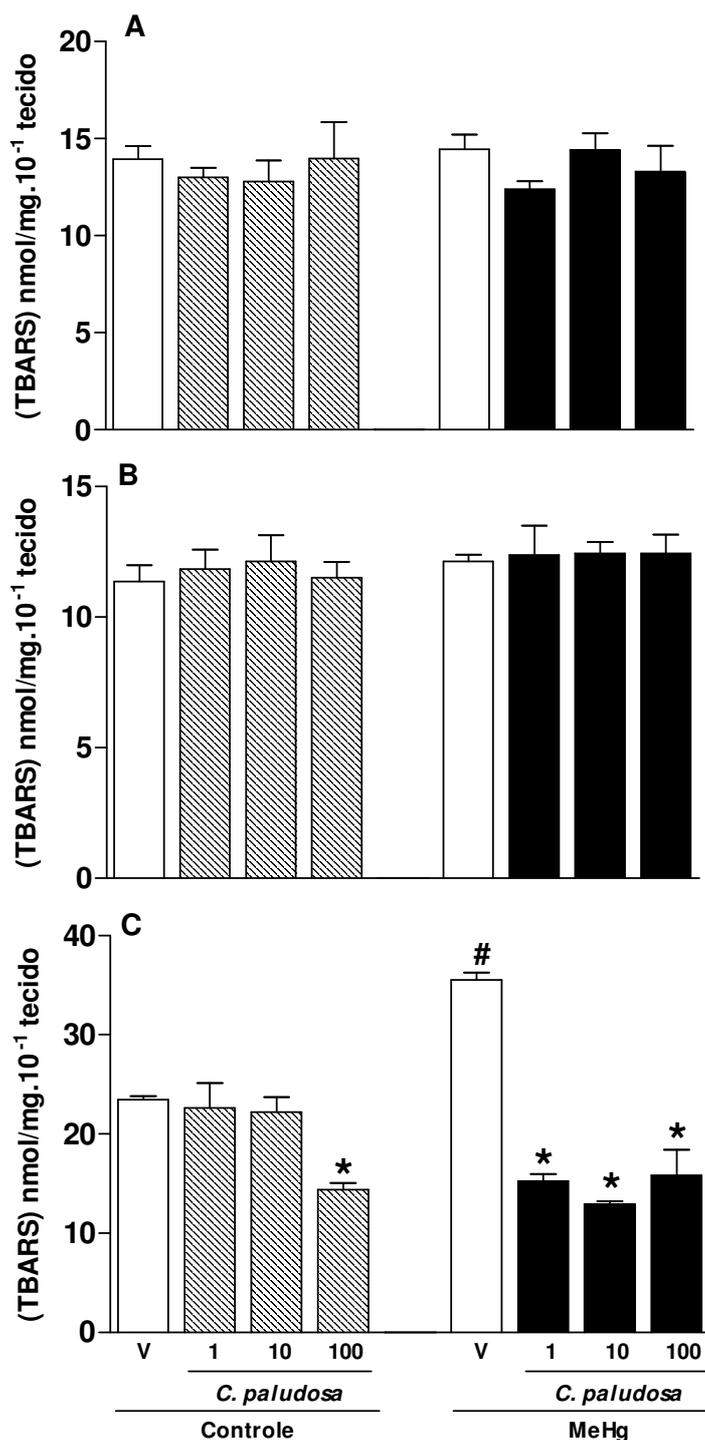


Gráfico 34: Efeito da administração crônica do EE da *C. paludosa* (1, 10 ou 100 mg/kg, v.o.) ou veículo (V) na peroxidação lipídica em tecidos cerebrais de proles adultas de ratas expostas ao MeHg, durante o período gestacional. Os resultados são expressos como a média \pm E.P.M. de 3 animais por grupo dos níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) nos tecidos cortical (A), hipocampal (B) e cerebelar (C). * $p < 0,05$ difere significativamente quando comparado ao tratamento com veículo do mesmo grupo. # $p < 0,05$ difere significativamente quando comparado ao tratamento com veículo do grupo controle (Teste de Newman-Keuls).

O gráfico 35 mostra os resultados dos níveis de TBARS no tecido de fígado de proles adultas expostas ao MeHg durante o período gestacional, bem como o tratamento crônico da administração oral do EE da *C. paludosa* (1, 10 ou 100 mg/kg) ou veículo (10 mL/kg). A análise estatística realizada pela ANOVA de uma via indicou um efeito significativo para o tratamento ($F_{(7,23)}=49,70$; $p<0,0001$). O teste de Newman-Keuls mostrou que o tratamento com o MeHg não alterou os níveis de TBARS no fígado. Além disso, o teste detectou que os tratamentos, com as três doses do EE, manteve baixo os níveis de TBARS quando comparado a seus respectivos controles.

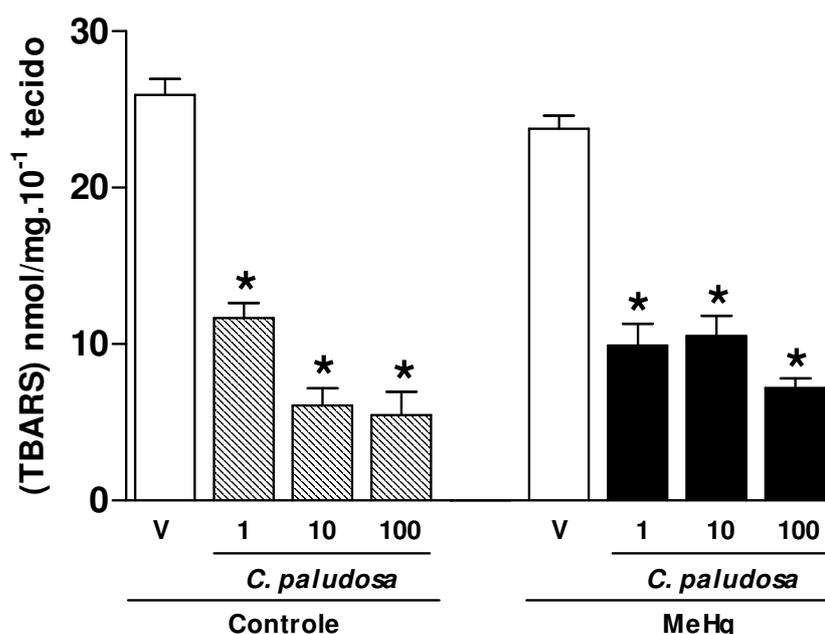


Gráfico 35: Efeito da administração crônica do EE da *C. paludosa* (1, 10 ou 100 mg/kg, v.o.) ou veículo (V) na peroxidação lipídica em tecido de fígado de proles adultas de ratos expostas ao MeHg durante o período gestacional. Os resultados são expressos como a média \pm E.P.M. de 3 animais por grupo dos níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). * $p<0,05$ difere significativamente quando comparado ao tratamento com veículo do mesmo grupo. # $p<0,05$ difere significativamente quando comparado ao tratamento com veículo do grupo controle (Teste de Newman-Keuls).

- **Peroxidação lipídica pelo método de alaranjado de xilenol**

O gráfico 36 A-C mostra a concentração de equivalentes de hidroperóxido de cumeno nos tecidos cerebrais de proles adultas de ratas expostas ao MeHg durante o período gestacional, bem como o tratamento crônico da administração oral do EE da *C. paludosa* (1, 10 ou 100 mg/kg) ou veículo (10 mL/kg). A ANOVA de uma via indicou um efeito significativo para o tratamento no tecido cerebelar ($F_{(7,23)}=10,94$; $p<0,0001$) (Gráfico 36 C).

O teste de Newman-Keuls mostrou que o tratamento com o MeHg aumentou a concentração de equivalentes de hidroperóxido de cumeno no tecido cerebelar (Gráfico 36 C) e este efeito foi revertido pelas três doses do EE da *C. paludosa*. Estes resultados confirmam os resultados obtidos do teste de TBARS.

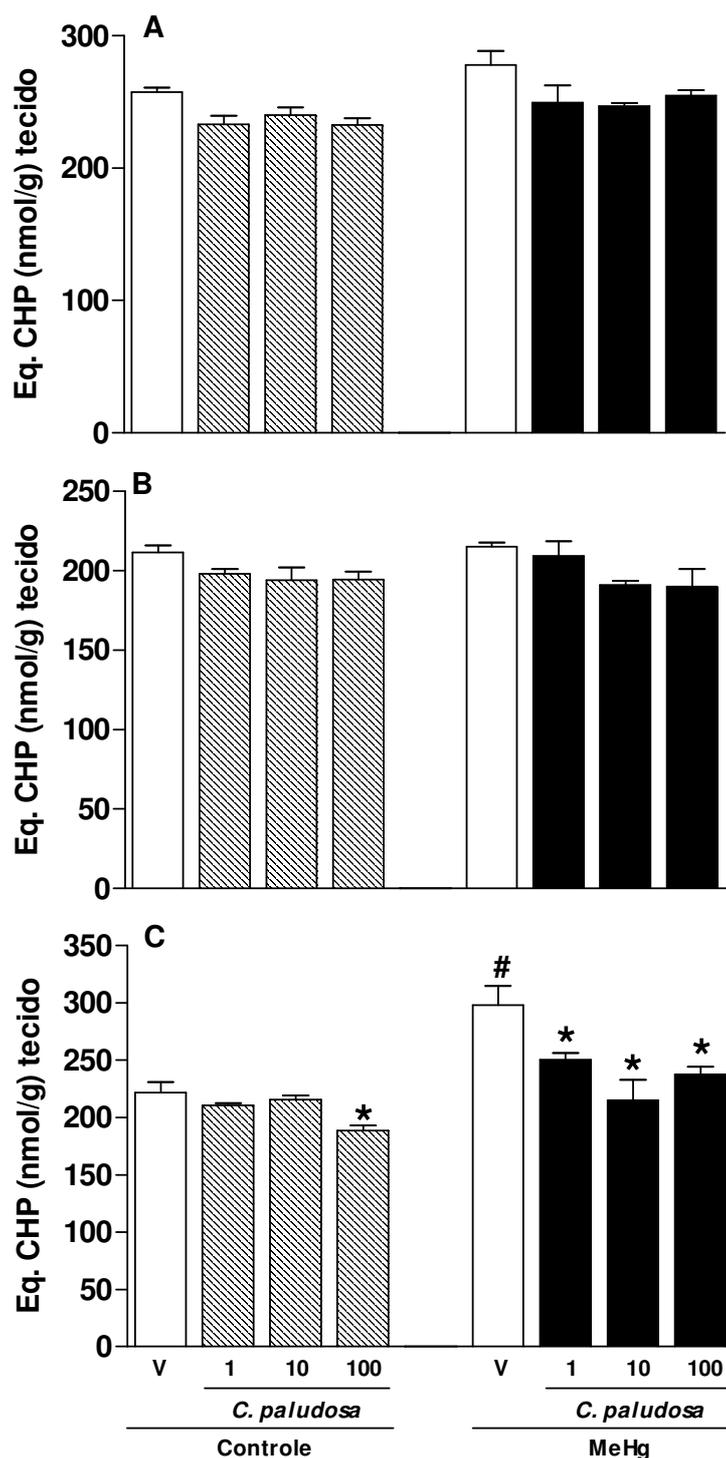


Gráfico 36: Efeito da administração crônica do EE da *C. paludosa* (1, 10 ou 100 mg/kg, v.o.) ou veículo (V) na concentração de equivalentes de hidroperóxido de cumeno (Eq. CHP) nos tecidos cerebrais de proles adultas de ratas expostas ao MeHg, durante o período gestacional. Os resultados são expressos como a média ± E.P.M. de 3 animais por grupo dos níveis de Eq. CHP nos tecidos cortical (A), hipocampal (B) e cerebelar (C). * $p < 0,05$ difere significativamente quando comparado ao tratamento com veículo do mesmo grupo. # $p < 0,05$ difere significativamente quando comparado ao tratamento com veículo do grupo controle (Teste de Newman-Keuls).

O gráfico 37 mostra a concentração de equivalentes de hidroperóxido de cumeno no tecido de fígado de proles adultas de ratas expostas ao MeHg no período gestacional, bem como o tratamento crônico da administração do EE da *C. paludosa* (1, 10 ou 100 mg/kg) ou veículo (10 mL/kg). A ANOVA de uma via indicou um efeito significativo para o tratamento no tecido ($F_{(7,23)}=257,2$; $p<0,0001$). O teste de Newman-Keuls indicou que os tratamentos com as três doses do EE diminuiu a concentração de equivalentes de hidroperóxido de cumeno quando comparados ao grupo controle, confirmando os resultados do teste de TBARS. Além disso, o teste indicou que tratamento com o MeHg não alterou a concentração de equivalentes de hidroperóxido de cumeno no tecido, e que esta foi significativamente diminuída pelo tratamento com o EE da *C. paludosa* nas doses de 10 e 100 mg/kg.

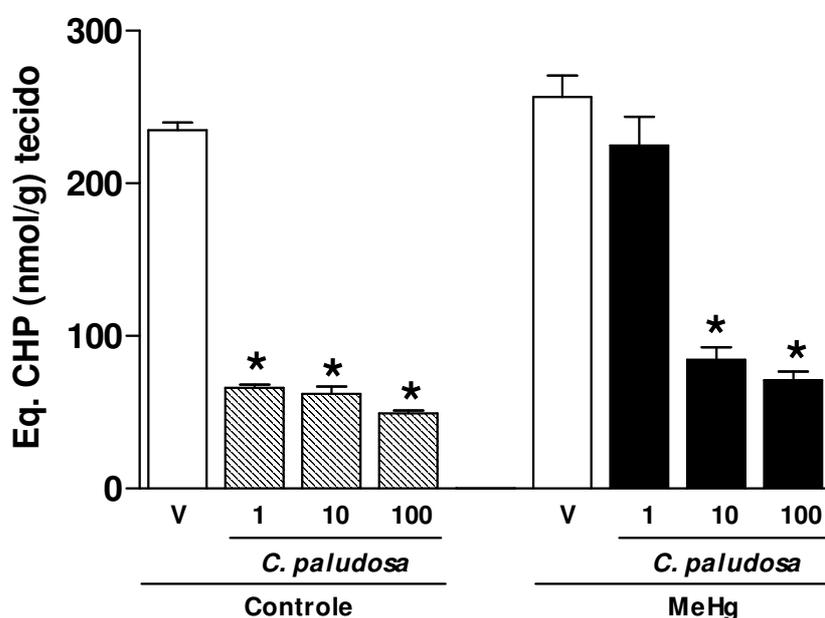


Gráfico 37: Efeito da administração crônica do EE da *C. paludosa* (1, 10 ou 100 mg/kg, v.o.) ou veículo (V) na concentração de equivalentes de hidroperóxido de cumeno (Eq. CHP) no tecido de fígado de proles adultas de ratas expostas ao MeHg durante o período gestacional. Os resultados são expressos como a média \pm E.P.M. de 3 animais. * $p<0,05$ difere significativamente quando comparado ao tratamento com veículo do mesmo grupo. # $p<0,05$ difere significativamente quando comparado ao tratamento com veículo do grupo controle (Teste de Newman-Keuls).

4. DISCUSSÃO

Os resultados obtidos no presente estudo, confirmam resultados prévios do nosso grupo (Maia *e cols.*, 2009a), demonstrando que uma única dose de MeHg (8 mg/kg), administrada durante a vida intrauterina, induz em respostas neurocomportamentais nas proles adultas, as quais apresentaram déficits emocionais com uma predisposição aos comportamentos do tipo ansiogênico e depressivo. Além disso, as proles adultas também apresentaram déficits cognitivos de aprendizado e memória. O presente estudo demonstrou que o tratamento crônico com o EE dos bulbos da *C. paludosa* nas doses de 1, 10 ou 100 mg/kg, atenuou esses déficits emocionais e cognitivos induzidos pela exposição prenatal ao MeHg em ratos.

Contaminantes ambientais têm sido propostos como uma das possíveis causas de distúrbios emocionais e de aprendizado em jovens, e doenças neurodegenerativas em idosos (Landrigan *e cols.*, 2005; National Research Council, 2000). O MeHg é conhecido por ser um potencial neurotóxico ambiental que provoca doenças neuropsicológicas em humanos (Gilbert e Grant-Webster, 1995). Efeitos neurotóxicos severos de exposição prenatal às altas doses de MeHg foram estabelecidos em humanos depois do desastre de MeHg no Japão e Iraque (Amin-Zaki *e cols.*, 1979; Harada, 1995) e confirmadas em estudos com animais (Burbacher *e cols.*, 1990).

Posteriormente, a exposição a baixas doses de MeHg encontrada em frutos do mar, foi considerada ser o fator de risco para desordens cognitivas e emocionais (por exemplo, perda de memória, déficit de atenção, e

comportamentos de ansiedade) em crianças e adolescentes das Ilhas Faroé que consumiam peixes da população (Debes *e cols.*, 2006; Grandjean *e cols.*, 1997).

A dose de MeHg, utilizada na realização do presente estudo, foi selecionada com base em estudos prévios da literatura e de nosso laboratório (Cagiano *e cols.*, 1990; Maia *e cols.*, 2009). A administração prenatal de MeHg na dose de 8 mg/kg no 15^o dia de gestação em ratas, apresentou um aumento significativo na concentração de MeHg cerebral. Este aumento foi 60 vezes maior do que o observado nos animais tratados com salina e se manteve três vezes maior até o 60 dias após o nascimento (Cagiano *e cols.*, 1990; Maia *e cols.*, 2009).

No presente estudo, ratos machos adultos expostos ao MeHg durante o 15^o dia gestacional apresentaram um claro desenvolvimento de comportamento do tipo ansiogênico, como indicado pela redução da frequência de entradas e do tempo gasto nos braços abertos do LCE. O tratamento crônico com o EE da *C. paludosa* (1, 10 ou 100 mg/kg, v.o.) reduziu esse comportamento induzido pela exposição prenatal ao MeHg em ratos, como indicado por um significativo aumento na exploração nos braços abertos do LCE. Esses resultados não podem ser explicados pelo déficit locomotor dos animais expostos ao MeHg, uma vez que o número total de entradas nos braços fechados não foi alterado no LCE.

Como discutido por outros autores (Cruz *e cols.*, 1994; File, 1992), o número de entradas nos braços fechados representa uma medida importante da atividade geral no LCE. Em acordo com os presentes resultados, dados recentes de nosso grupo de pesquisa (Maia *e cols.*, 2009) e outros (Cagiano *e cols.*, 1990; Carratù *e cols.*, 2006; Ferraro *e cols.*, 2009) têm mostrado que a exposição aguda

a baixos níveis de MeHg durante o início ou final do período gestacional não resultam em grande prejuízo da função motora, uma vez que a performance dos ratos expostos ao MeHg (no 40-60 dias após o nascimento) nos testes de campo aberto e *rota-rod* não foram diferentes significativamente daquelas mães tratadas com o controle.

No presente estudo também foi analisado os efeitos da exposição prenatal ao MeHg no comportamento do tipo depressivo, um tópico pouco abordado em estudos anteriores. Foi utilizado o teste do nado forçado, geralmente considerado como um modelo animal de depressão (Porsolt *e cols.*, 1978). Nesse teste, ratos adultos expostos prenatalmente ao MeHg mostraram um maior aumento significativo no tempo de imobilidade, representando um comportamento do tipo depressivo.

Corroborando com esses dados, Onishchenko *e cols.* (2007) demonstraram um comportamento do tipo depressivo similar em camundongos adultos nascidos de mães tratadas com MeHg (0,5 mg/kg/dia) adicionada na água de beber, desde o sétimo dia de gestação até o sétimo dia após o nascimento. Além disso, as síndromes depressivas têm sido relatadas em humanos que tiveram uma exposição ocupacional ao mercúrio inorgânico (Grum *e cols.*, 2006). Interessante em nosso estudo, foi que o tratamento crônico com o EE da *C. paludosa* (1, 10 ou 100 mg/lg, v.o.) reverteu o comportamento do tipo depressivo associado com a exposição prenatal ao MeHg.

Em trabalho recente realizado por nosso grupo, demonstrou-se os efeitos protetores do EE da *C. paludosa* contra a neurotoxicidade induzida pelo MeHg em camundongos adultos (Lucena *e cols.*, 2007b).

O MeHg é um composto altamente neurotóxico que acarreta em vários déficits neurológicos e de desenvolvimento em animais e humanos (Clarkson e cols., 2003). No referido trabalho, Lucena e cols. (2007b) demonstraram que os animais tratados com o MeHg apresentaram um déficit locomotor e na coordenação motora. Importante ressaltar que, o tratamento dos animais com o EE da *C. paludosa* foi capaz de reverter o déficit locomotor induzido pelo MeHg. Além disso, foi observado que os animais expostos ao MeHg apresentaram um inibição (42%) nos níveis da GPx cerebelar, uma importante enzima de detoxificação de peróxidos endógenos, e esse efeito foi revertido pela co-administração com o EE da *C. paludosa*, sugerindo um efeito neuroprotetor da espécie.

Além dos testes relacionados a comportamentos emocionais do tipo ansiogênico ou depressivo, foram realizados dois testes para avaliar a cognição dos animais expostos prenatalmente ao MeHg e tratados cronicamente com o EE da *C. paludosa* (1, 10 ou 100 mg/kg, v.o.). Os testes usados para avaliar a memória dos animais foram o de reconhecimento social e de esquiva inibitória do tipo “*step-down*”, os quais abordam dois tipos diferentes de memória, a memória operacional e a memória espacial, respectivamente.

Segundo Izquierdo (2002), a memória é a aquisição, a formação, a conservação e a evocação de informações. É uma faculdade cognitiva importante porque ela forma a base para a aprendizagem (aquisição) e envolve um conjunto de sistemas cerebrais que funcionam juntos por meio de células nervosas (neurônios) que, quando ativadas, liberam hormônios ou neurotransmissores que atingem outras células nervosas através de sinapses.

Há várias classificações de memórias, de acordo com a sua função, com o tempo que duram e com o seu conteúdo.

De maneira simplificada, a memória pode ser classificada em memória de curto-prazo e memória de longo-prazo.

- Memória de curto-prazo: também chamada de memória operacional ou de trabalho, serve para manter durante alguns segundos a informação que está sendo processada no momento. Um exemplo é o local onde estacionamos o carro, uma informação que será necessária até o momento de chegarmos até o carro. Neste caso, há a ativação elétrica de neurônios do córtex-pré-frontal, com poucas alterações bioquímicas (Izquierdo, 2002);
- Memória de longo-prazo: é classificada em memória declarativa (ou explícita) ou não-declarativa (ou implícita). Podem durar alguns minutos, horas, meses a anos. Um exemplo é o aprendizado de uma nova língua. Neste caso, há a síntese de novas proteínas principalmente no hipocampo (Izquierdo, 2002);

A memória declarativa é a capacidade de verbalizar um fato, como por exemplo, lembrança de datas, números de telefone, fatos históricos, etc. Classifica-se por sua vez em:

- *Episódica*: quando envolve eventos relacionados ao tempo. Exemplo: A queda do muro de Berlim, em 8 de novembro de 1989.

- *Semântica*: abrange a memória do significado das palavras, sem envolver conceitos temporais. Exemplo: A capital da França é Paris.

A memória não-declarativa se difere da declarativa porque não precisa ser verbalizada, declarada. É a memória para procedimentos e habilidades, por exemplo, a habilidade para dirigir, dá um laço no cordão do tênis, jogar bola, etc. Pode ser classificada em:

- *Memória associativa*: relacionada a algum tipo de resposta ou comportamento. Exemplo: pensar em uma pessoa pelo simples fato de um cheiro de um perfume característico.

- *Memória não-associativa*: se diferencia da associativa, por aprendermos um estímulo repetitivo sem nos darmos conta. Exemplo: o latido de um cão feroz nos traz riscos, o que nos faz sentir medo.

- *Memória de procedimento*: relacionada a capacidades ou habilidades motoras ou sensoriais e o que habitualmente chama-se de “hábitos”. Exemplo: são as memórias de como andar de bicicleta, nadar, soletrar, etc.

- *Memória priming*: é a memória adquirida e evocada por meio de “dicas”. Exemplo: fragmentos de uma imagem, certos gestos, odores ou sons.

Nos testes de memória social, os dados do presente estudo mostraram um efeito facilitador da memória em ratos tratados cronicamente com o EE da *C. paludosa*, apresentando uma melhora na capacidade de reconhecer um rato jovem, quando este foi re-exposto ao rato adulto após um período de 120 min da primeira apresentação, sugerindo uma melhora na memória de curta duração dos animais. Esse efeito se manteve constante quando um rato jovem diferente foi

apresentado novamente ao rato adulto, após o mesmo intervalo de tempo. Entretanto, esse comportamento facilitador da memória não foi observado nos animais do grupo do MeHg.

Os resultados mostraram que os animais expostos prenatalmente ao MeHg apresentaram um prejuízo na capacidade de reconhecer um rato jovem, quando re-exposto ao rato adulto após um curto intervalo de tempo de 30 min, sugerindo um prejuízo na memória social. Este teste é um modelo de memória olfatória de curta duração que pode ser facilitada por drogas que melhoram os processos de aprendizado e memória (Prediger *e cols.*, 2005b; Terranova *e cols.*, 1996), e prejudicada por processos fisiopatológicos (como isquemia, envelhecimento, exposição a neurotóxicos, entre outros) que interferem nos processos de aprendizado e memória (Prediger *e cols.*, 2005a).

Os resultados presentes neste estudo estão de acordo com a literatura, indicando que a exposição prenatal ao MeHg pode acarretar déficits cognitivos, afetando áreas cerebrais envolvidas em processos mnemônicos (Maia *e cols.*, 2009, 2010; Neese *e cols.*, 2004). Sendo assim, esses dados são os pioneiros, pelo menos ao nosso conhecimento, mostrando o efeito da exposição prenatal ao MeHg no modelo de memória social em ratos.

Tem sido reconhecido que muitas plantas medicinais podem melhorar a memória e funções cognitivas relacionadas às doenças neurodegenerativas (Chonpathompikunlert *e cols.*, 2010; Ho *e cols.*, 2009; Prediger *e cols.*, 2008), entre elas plantas pertencentes a família Iridaceae (Sugiura *e cols.*, 1994, 1995; Zhang *e cols.*, 1994; Pitisikas e Sakellaridis., 2006; Pitisikas *e cols.*, 2007).

A memória espacial, por sua vez, foi avaliada no teste da esQUIVA inibitória do tipo “*step-down*”. Neste teste há a observação de dois tipos de memória, a de curto-prazo (1,5 h após a sessão treino) e a de longo-prazo (24 h após a sessão treino).

Os resultados presentes neste estudo demonstraram que o tratamento com todas as doses do EE da *C. paludosa* apresentou um efeito facilitador na retenção da memória de curta e longa duração, quando comparado aos animais do grupo controle. Este efeito facilitatório do EE é dissociado de qualquer efeito sedativo ou relaxante inespecífico, como foi comprovado pelo teste de campo aberto realizado nos animais. Entretanto, as proles adultas expostas prenatalmente ao MeHg apresentaram déficits na memória espacial quando comparados aos animais controles, mostrando que os animais do grupo do MeHg apresentaram dificuldades neste tipo de aprendizado.

Estes resultados estão de acordo com trabalhos prévios da literatura que mostram déficits cognitivos na memória espacial de ratos expostos prenatalmente ao MeHg (Gralewicz e cols., 2009). Importante ressaltar que o tratamento com o EE da *C. paludosa* reverteu o déficit cognitivo induzido pela exposição prenatal ao MeHg.

As bases neuroquímicas das alterações induzidas pelo MeHg podem acarretar distúrbios em vários sistemas de neurotransmissores, aparecendo inicialmente durante a exposição e seguida de mudanças duradouras no funcionamento cerebral, acarretando anormalidades nas funções neuronais devido a uma toxicidade por MeHg, que inclui alteração na homeostase do Ca^{2++} , excitotoxicidade mediada pelo glutamato, e uma indução de estresse oxidativo

(Aschner e cols., 2007; Carratù e cols., 2006; Castoldi e cols., 2001; Farina e cols., 2005; Lucena e cols., 2007b).

Embora o estresse oxidativo e a alteração na homeostase do glutamato serem mecanismos distintos relacionados à neurotoxicidade induzida pelo MeHg, eles são intimamente relacionados. De fato, uma ativação de receptores glutamatérgicos *N*-metil-D-aspartato (NMDA) leva ao aumento do grande influxo de íons Ca^{2++} . A sobrecarga intracelular de Ca^{2++} é associada com a geração de EROs, as quais degradam estruturas celulares (Lafon-Cazal e cols., 1993). De particular importância, estudos do nosso grupo têm mostrado que o EE da *C. paludosa* protegeu o estresse oxidativo induzido pelo MeHg (Lucena e cols., 2007b) e inibiu a nocicepção induzida pelo glutamato em camundongos, sugerindo um potencial efeito “antioxidante” e “antiglutamatérgico” da *C. paludosa*.

A neurotoxicidade induzida pelo MeHg é um fenômeno bem descrito na literatura. Entretanto, ainda não há tratamentos efetivos avaliados para a exposição ao neurotóxico. O tratamento com agentes quelantes com o intuito de eliminar o mercúrio dos tecidos é de uso limitado devido aos seus efeitos adversos (Tchounwou e cols., 2003). O MeHg possui grande especificidade com proteínas no SNC (Fonfría e cols., 2001).

O presente estudo mostrou uma diminuição nos níveis da catalase nos tecidos cortical e hipocampal de ratos adultos expostos prenatalmente ao MeHg. Esses efeitos foram revertidos pelo tratamento com o EE da *C. paludosa* (1, 10 ou 100 mg/kg, v.o.).

Além disso, foi observada uma diminuição na atividade da Se-GPx no tecido cerebelar. Em acordo com dados prévios de nosso grupo (Lucena *e cols.*, 2007b) foi possível correlacionar as propriedades pro-oxidantes do MeHg e seus efeitos deletérios na coordenação motora, pela diminuição da atividade da Se-GPx no tecido cerebelar e indução no prejuízo da atividade locomotora em camundongos adultos.

A Se-GPx é crucial para a detoxificação de peróxidos endógenos. Entretanto, pouco se sabe sobre essa relação em regiões anatomicamente específicas do cérebro. O MeHg causa uma redução na glutatona intracelular e na catalase (Miura e Clarkson, 1993; Gatti *e cols.*, 2004; Grotto *e cols.*, 2009) e aumento na formação de EROs (Shanker e Aschner, 2003; Zhang *e cols.*, 2009). Os dados presentes neste trabalho mostraram que o EE da *C. paludosa* (1-100 mg/kg) reverteu as alterações comportamentais e bioquímicas induzidas pelo MeHg, sugerindo uma potencial relação farmacológica entre eles.

Além da medida das enzimas antioxidantes catalase e Se-GPx, o presente estudo mediu os níveis de peroxidação lipídica, em tecidos cerebrais e de fígados, de ratos adultos expostos prenatalmente ao MeHg durante o período gestacional.

Para a determinação dos níveis de peroxidação lipídica foram utilizadas duas metodologias. A primeira metodologia foi a de TBARS, conforme já explicada anteriormente. Os níveis de peroxidação lipídica também foram medidos pelo método de alaranjado de xilenol.

Os dados presentes neste estudo mostraram aumento nos níveis de TBARS e de hidroperóxidos lipídicos nos tecidos cerebelar de ratos adultos expostos prenatalmente ao MeHg. Interessante ressaltar, que este efeito foi

revertido pelo tratamento crônico com o EE da *C. paludosa*. No tecido de fígado, o tratamento com o MeHg não mostrou diferença em relação aos grupos controles, entretanto, novamente o tratamento com o EE da *C. paludosa* diminuiu significativamente a peroxidação lipídica, tanto pelo método de TBARS, quanto pelo método de alaranjado de xilenol, sugerindo um efeito protetor do EE da planta.

Nos tecidos cerebrais pode estar havendo uma redução da atividade de aldeído desidrogenase, que degrada moléculas como o malondialdeído (Fong e Choy, 2001), resultando assim no aumento dos níveis de TBARS. O malondialdeído é o produto do ataque das EROs aos ácidos graxos insaturados e reage com TBA, formando TBARS. Recentemente, em estudo realizado por de Freitas e cols. (2009) em camundongos adultos, observou-se que o tratamanto por 35 dias com o MeHg (2 mg/kg, dia) aumentou os níveis de TBARS nos tecidos de fígado, rim, cérebro e cerebelo.

Baseado em dados da literatura, esses resultados sugerem que o efeito prejudicial do MeHg na coordenação motora avaliada no teste do campo aberto, nos comportamentos do tipo ansiogênico e depressivo, e os déficits de aprendizado e memória, estão correlacionados aos efeitos deletérios pro-oxidativos no córtex e cerebelo de ratos, demonstrados por uma redução da enzima catalase no tecido cortical e por uma significativa redução da atividade de Se-GPx no tecido cerebelar, seguido de um aumento significativo nos níveis de peroxidação lipídica.

Esses resultados sugerem que o estresse oxidativo advindo da exposição prenatal ao MeHg, possui grande afinidade com proteínas no SNC, que pode

alterar parâmetros comportamentais e bioquímicos em proles adultas de ratos. A propriedade antioxidante presente no EE da *C. paludosa* parece estar representando um possível mecanismo molecular envolvido no presente efeito do EE contra os déficits comportamentais de ratos expostos prenatalmente ao MeHg.

5. CONCLUSÕES PARCIAIS

Em conjunto, o presente estudo mostrou que a exposição prenatal ao MeHg produz alterações comportamentais a longo prazo do tipo ansiogênicas e depressivas, além de severos déficits cognitivos em proles adultas e alterações nos parâmetros oxidantes em tecidos cerebrais e de fígado. Esses resultados reforçam que a exposição à neurotóxicantes, como o MeHg, durante o desenvolvimento do SNC, é um possível fator de risco para o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas.

Além disso, os dados deste estudo sugerem um efeito protetor do EE da *C. paludosa*, por apresentar uma ação antioxidante e inibir níveis de peroxidação lipídica em tecidos cerebrais. Assim, essa espécie, aqui estudada, pode representar valiosa ferramenta para melhorar déficits emocionais e/ou cognitivos produzidos pela exposição prenatal ao MeHg.

CAPÍTULO 4

***Cipura paludosa x
EtOH+MeHg***

EFEITOS DA *C. paludosa* EM RATOS ADULTOS EXPOSTOS AO EtOH E MeHg DURANTE OS PERÍODOS GESTACIONAL E LACTACIONAL

1. INTRODUÇÃO

1.1. Qual o interesse em se estudar a associação EtOH x MeHg?

Estudos envolvendo o álcool e suas interações com outros neurotóxicos representam o foco de muitas pesquisas, visto que todas essas interações se constituem sérios problemas de saúde e que, infelizmente, até então, nenhuma terapia eficaz é capaz de tratar, ou mesmo prevenir, os malefícios causados por elas. A exposição fetal ao álcool e ao mercúrio tem uma alta incidência em algumas regiões do Brasil, especialmente nas áreas próximas à mineração, onde há mulheres grávidas que são dependentes de álcool.

Apesar da grande quantidade de informações sobre os efeitos deletérios decorrentes do consumo de álcool, não existe um nível seguro estabelecido para o consumo desta substância na gravidez. Mulheres nessa condição, que consomem bebidas alcoólicas em excesso, estão mais suscetíveis a gerar filhos com anormalidades no desenvolvimento físico e mental (Pollard, 2007; Rasmussen *e cols.*, 2009).

A literatura mostra que, aproximadamente, 10% das mulheres grávidas consomem bebida alcoólica, sendo que 2% delas estão envolvidas com o consumo frequente ou excessivo (CDC, 2004), sendo que o período gestacional em que se encontra é relevante diante das consequências dos seus efeitos (Monsen, 2009). Este risco é muito maior quando esta situação ocorre nas

localidades próximas às áreas de mineração, por conta da interação com outro neurotóxico, o mercúrio.

Nessas áreas ribeirinhas, além da exposição ao álcool, a contaminação pelo mercúrio, usado na extração do ouro, também atinge a saúde da população de mulheres grávidas. Tal ação deletéria se dá por meio da utilização do mercúrio na atividade garimpeira, que é capaz de interagir com ciclos geoquímicos e cadeias tróficas, elevando suas concentrações na natureza por meio de sua forma metilada de MeHg. Esta substância pode permanecer por vários anos na natureza sem sofrer ação e/ou degradação de fatores ambientais (Azevedo, 2003).

Esta habilidade do mercúrio, associada à capacidade do composto inorgânico em sofrer metilação em ambientes aquáticos, e nesta condição ser bioacumulado, faz com que ele alcance teores extremamente elevados no topo da cadeia alimentar. Dessa forma, a ação dos compostos mercuriais no meio ambiente ocasionou vários episódios de intoxicação e contaminação no ecossistema (Azevedo, 2003).

Estudos avaliando o EtOH e o MeHg, como substâncias neurotóxicas, representam o foco de muitas pesquisas. Por outro lado, a associação dessas duas substâncias neurotóxicas, durante o período de gestação e de amamentação, é um assunto pouco abordado na literatura, ainda que a exposição concomitante tenha uma alta incidência em regiões de garimpo do Brasil, onde existem mulheres grávidas que consomem álcool e vivem próximas às áreas de mineração, onde há grande contaminação mercurial (Pinheiro e cols., 2008).

Outro interesse em investigarmos a interação EtOH x MeHg é o aspecto ambiental e saúde na Amazônia. Os estudos realizados, até hoje, permitiram que as autoridades de saúde definissem um quadro clínico característico da doença de Minamata, quando esta se encontra em estado avançado de comprometimento neurológico, mas existe ainda uma considerável incerteza sobre os sintomas apresentados pelos pacientes nos primeiros estágios da doença, sobre os melhores métodos de diagnóstico precoce, sobre a correlação entre nível de mercúrio ingerido e o aparecimento dos diversos sintomas e quais os mecanismos neuropatológicos pelos quais o mercúrio afeta as células do organismo humano, inclusive os neurônios centrais e periféricos.

Estas perguntas são centrais ao problema da poluição ambiental pelo mercúrio e saúde humana na Amazônia, além de possibilitar a investigação de fármacos que possam atenuar ou reverter os quadros degenerativos, com a utilização de produtos naturais da própria Amazônia baseado em modelos experimentais de neurodegeneração e neuroproteção.

1.2. Interação EtOHxMeHg: implicações para o SNC em desenvolvimento

Embora a toxicidade desses dois compostos isolados seja bem estudada, a interação entre eles não é bem entendida (Lucena *e cols.*, 2010b). Entre os resultados encontrados, foram observados os efeitos do EtOH quanto à morbimortalidade e distribuição do MeHg nos tecidos de ratos tratados oralmente com dose diária de 5 mg/kg de MeHg, por 10 dias consecutivos. O EtOH potencializou a toxicidade do MeHg quanto as manifestações neurológicas e mortalidade (Tamashiro *e cols.*, 1986). Além disso, essa associação levou

inicialmente a um ganho, seguida de uma perda, dos pesos corporais de ratos que apresentaram intensa ataxia (Turner *et al.*, 1981).

Os efeitos do cloreto de MeHg no metabolismo do EtOH também aparece como alvo de pesquisa. Dose diária de 10 mg/kg do MeHg, administrada intraperitonealmente por dois dias consecutivos; e 0,4 g/kg de EtOH administrado intravenosamente, 24 h após o pré-tratamento, mostrou que o MeHg teve pouca influência no metabolismo do EtOH devido as suas ligações não-específicas com o grupo sulfidril no organismo (Ohmiya e Nakai, 1977).

Visando entender melhor as divergências de informações a respeito dessa interação, estudos recentes realizados em animais experimentais, por nosso grupo de pesquisa, demonstraram que esta associação pode causar prejuízos relacionados ao peso corpóreo, onde os animais submetidos à intoxicação concomitante dos dois neurotóxicos apresentaram, ao nascer, peso significativamente menor que os animais tratados com os neurotóxicos de forma isolada. Esta diferença no peso corpóreo se manteve até os animais atingirem a idade de adultos jovens (Maia *et al.*, 2009a).

Neste mesmo estudo relatado, anteriormente, também foi observado que os animais apresentaram déficits comportamentais relacionados aos transtornos de ansiedade e processos mneumônicos, quando submetidos a testes específicos como o LCE e a esquiva inibitória, respectivamente. Entretanto, este estudo demonstrou que outros distúrbios comportamentais não foram evidenciados, como a depressão (Maia *et al.*, 2009a).

É importante ressaltar que quando avaliada a dosagem de mercúrio nos pelos maternos das ratas e da sua prole, houve uma diminuição na concentração desse componente no grupo de animais submetidos à intoxicação associada (Maia *et cols.*, 2009a). Outros autores já haviam observado esta possível interação toxicocinética. Grandjean e Weihe (1993) realizaram um estudo com 1.000 crianças, na ilha Faroé, e encontraram dados que demonstravam que o consumo de EtOH por mulheres grávidas causou uma diminuição nas concentrações de mercúrio no cordão umbilical, que eles atribuíram à interação toxicocinética entre o EtOH e o mercúrio.

Em pesquisas posteriores, nosso grupo também demonstrou que a intoxicação pelo EtOH e MeHg alteraram a homeostase neuroquímica do óxido nítrico (NO), o que poderia justificar as alterações comportamentais observadas nas proles adultas de ratos, uma vez que este mediador químico tem papel fundamental nos processos cognitivos de aprendizagem e memória, assim como desordens relacionadas à ansiedade (Maia *et cols.*, 2009b).

Além disso, no mesmo trabalho acima, observou-se que a intoxicação pelo EtOH e MeHg ocasionou um aumento da atividade nitrérgica na região anteroventral do estriado e na maioria das camadas do Corno de Amon 1 hipocampal, que são estruturas relacionadas à memória. O cerebelo apresentou-se menos afetado pela intoxicação experimental. Estes resultados demonstram que o SNC pode ser diferentemente afetado pela toxicidade intrauterina do EtOH e MeHg, causando um aumento da atividade nitrérgica em estruturas cerebrais de diferentes formas, resultando em consequências deletérias e permanentes ainda na fase adulta (Maia *et cols.*, 2009b).

Diante deste contexto, nosso estudo objetivou examinar as alterações decorrentes desta interação sobre o SNC em desenvolvimento e sua relação com o estresse oxidativo e com o tratamento crônico com o EE da *C. paludosa*.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Animais e Tratamento

Os procedimentos quanto ao cruzamento dos animais e detecção das ratas grávidas já foram previamente descritos na página 53. Para o tratamento, ratas grávidas (n=20) receberam água de torneira ou EtOH 22,5 p/v (6,5 g/kg) diariamente. No 15^o dia de gestação, o MeHg (8 mg/kg) foi administrado em cada grupo. Este período é um estágio de desenvolvimento em que a zona ventricular cerebral do feto produz neurônios no córtex cerebral embrionário (DiCicco-Bloom e Sondell, 2005).

As soluções foram administradas por via oral, em volumes de 1 mL/kg de peso corpóreo total. A dose para o tratamento com EtOH e MeHg foi baseada na literatura e em resultados pilotos realizados em nosso laboratório (Cagiano *e cols.*, 1990; Maia *e cols.*, 2009; Maier e West, 2001; Zanolli *e cols.*, 1994), os quais demonstraram déficits comportamentais em ratos adultos expostos ao EtOH e MeHg, durante o desenvolvimento fetal. Portanto, o esquema de tratamento atual com o EtOH e MeHg representa um modelo para o estudo de déficits comportamentais de longa duração de intoxicação durante a gravidez.

Após o nascimento, as proles foram mantidas com a mãe até o 21^o dia (desmame), sendo estas separadas por sexo e grupo experimental controle (C) e EtOH+MeHg. Ao atingirem dois meses de idade, as proles foram separadas em

subgrupos de animais para receberem tratamento crônico, por gavagem, por 14 dias que antecederam os testes comportamentais. O tratamento com o EE da *C. paludosa* ou veículo (salina) foi realizado nas proles machos e nas doses de 1, 10 ou 100 mg/kg, com n=10 animais por grupo. O interesse em se investigar estas três doses do EE da *C. paludosa* já foi mencionado na página 54.

2.2. Testes comportamentais

As metodologias empregadas nos testes comportamentais foram descritas previamente no primeiro capítulo nas páginas 18 a 25.

2.3. Testes bioquímicos

2.3.1. Preparação dos tecidos

Para a preparação dos tecidos seguiu-se a mesma metodologia previamente descrita no segundo capítulo, presente nas páginas 54-55.

2.3.2. Determinação das atividades enzimáticas

- Preparo dos extratos proteicos

A metodologia empregada para o preparo dos extratos proteicos foi previamente descrita no segundo capítulo, na página 55.

- Atividade de enzimas antioxidantes

A metodologia empregada nos ensaios de atividade de enzimas antioxidantes foi descrita previamente no segundo capítulo, que compreende os testes para medir a atividade da catalase (páginas 55-56) e da Se-GPx (páginas 56-57).

2.3.3. Concentração de proteína

Para a medição da concentração protéica dos tecidos seguiu-se a mesma metodologia descrita no segundo capítulo, presente na página 58.

2.3.4. Indicadores de danos oxidativos

As metodologias empregadas nos ensaios de indicadores oxidativos foram descritas previamente no segundo capítulo, que compreende os testes para medir a peroxidação lipídica pelo método de TBARS (páginas 58-60) e pelo método de alaranjado de xilenol (páginas 60-61).

2.4. Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas conforme descrito no primeiro capítulo, presente nas páginas 26- 27.

3. RESULTADOS

3.1. Teste da Atividade locomotora espontânea

Os efeitos do tratamento crônico com o EE da *C. paludosa* (1, 10 ou 100 mg/kg, v.o.), veículo (10 mL/kg, v.o.), DZP (1 mg/kg, v.o.), FXT (10 mg/kg, v.o.), CAF (10 mg/kg, v.o.), em ratos adultos expostos prenatalmente ao EtOH+MeHg, avaliados no teste do campo aberto, estão presentes no gráfico 38. A ANOVA de uma via não indicou diferença significativa entre os grupos ($F_{(10,109)} = 0,8636$, $p=0,5699$).

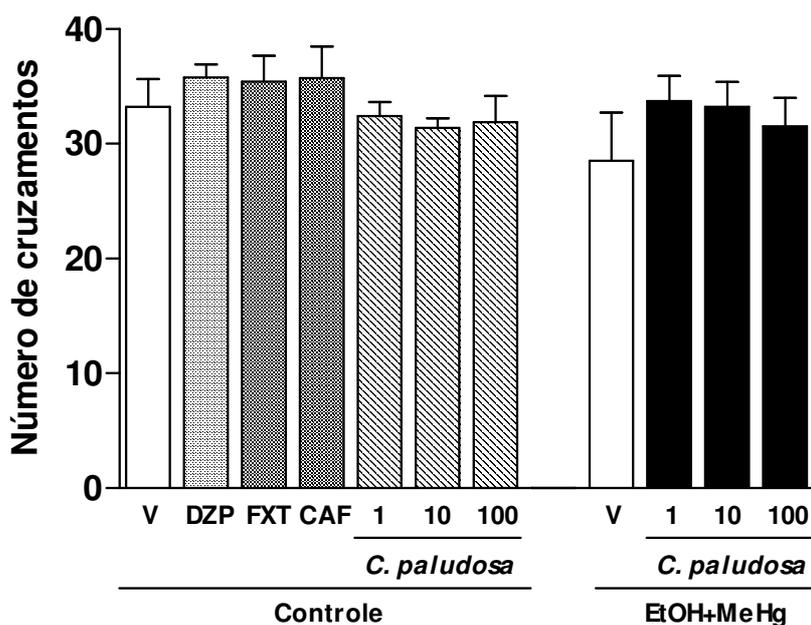


Gráfico 38: Efeito da administração crônica do EE da *C. paludosa* (1, 10 ou 100 mg/kg, v.o.) ou veículo (V) na atividade locomotora de proles adultas de ratas expostas ao EtOH+MeHg, durante o período gestacional e lactacional, avaliadas no teste do campo aberto, durante 5 min. DZP (1 mg/Kg), FXT (10 mg/Kg) ou CAF (10 mg/kg) foram utilizados como controles positivos. Os resultados são expressos como a média \pm E.P.M. de 10 animais por grupo. * $p < 0,05$ difere significativamente quando comparado ao tratamento com veículo do mesmo grupo. # $p < 0,05$ difere significativamente quando comparado ao tratamento com veículo do grupo controle (Teste de Newman-Keuls). DZP=diazepam, FXT=fluoxetina, CAF=cafeína.

3.2. Teste do LCE

Os efeitos do tratamento crônico da administração oral do EE da *C. paludosa* (1, 10 ou 100 mg/kg), veículo (10 mL/kg) ou DZP (1 mg/kg, controle positivo), em proles adultas de ratas expostas ao EtOH+MeHg, durante o período gestacional e lactacional avaliados no teste do LCE estão presentes no gráfico 39 A-C. A ANOVA de uma via revelou efeitos significantes para os fatores de tratamento na %EBA ($F_{(8,89)} = 10,11$; $p \leq 0,0001$; Gráfico 39 A), na %TBA ($F_{(8,89)} = 7,23$; $p \leq 0,0001$; Gráfico 39 B), mas não significante para o número de EBF ($F_{(8,89)} = 1,226$; $p = 0,2948$; Gráfico 39 C).

O teste de Newman-Keuls revelou uma redução significativa na %TBA (Gráfico 39 B), sem alterar o número de EBF (Gráfico 39 C) nas proles adultas expostas prenatalmente ao EtOH+MeHg, indicando um pronunciado comportamento do tipo ansiogênico, quando comparadas ao grupo controle. Além disso, a administração crônica com o EE da *C. paludosa* (1, 10 ou 100 mg/kg) produziu um aumento na %EBA durante o teste do LCE (Gráfico 39 A) e a dose de 100 mg/kg um aumento na %TBA (Gráfico 39 B). Esses dados indicam que o tratamento com o extrato da *C. paludosa* foi capaz de reduzir o comportamento do tipo ansiogênico produzido pela exposição prenatal ao EtOH+MeHg, em proles adultas de ratos.

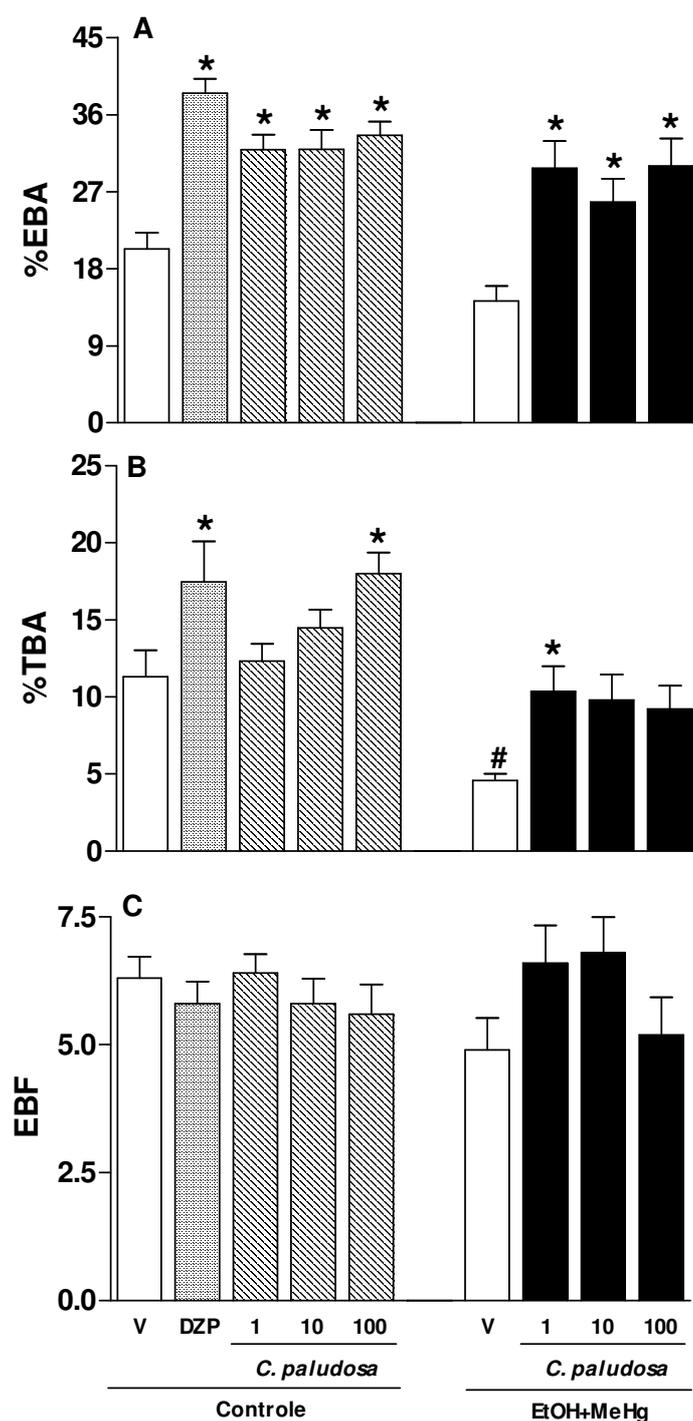


Gráfico 39: Efeito da administração crônica do EE da *C. paludosa* (1, 10 ou 100 mg/kg, v.o.) ou veículo (V) na percentagem de entradas nos braços abertos (%EBA) (A), na percentagem de tempo nos braços abertos (%TBA) (B) e no número de entradas nos braços fechados (EBF) (C) em proles adultas de ratas expostas ao EtOH+MeHg, durante o período gestacional e lactacional, avaliados no teste do LCE, durante 5 min. DZP (1 mg/Kg, v.o.) foi utilizado como controle positivo. Os resultados são expressos como a média \pm E.P.M. de 10 animais por grupo. * $p < 0,05$ difere significativamente quando comparado ao tratamento com veículo do mesmo grupo. # $p < 0,05$ difere significativamente quando comparado ao tratamento com veículo do grupo controle (Teste de Newman-Keuls). DZP=diazepam.

3.3. Teste do nado forçado

Os efeitos do tratamento crônico da administração oral do EE da *C. paludosa* (1, 10 ou 100 mg/kg), veículo (10 mL/kg) ou FXT (10 mg/kg, controle positivo), em proles adultas de ratas expostas ao EtOH+MeHg, durante o período gestacional e lactacional, avaliadas no teste do nado forçado, estão demonstrados no gráfico 40 A-C. ANOVA de uma via revelou efeitos significantes para os fatores de tratamento no tempo de subida ($F_{(8,89)} = 7,068$; $p \leq 0,0001$; Gráfico 40 A), no tempo de nado ($F_{(8,89)} = 4,943$; $p \leq 0,0001$; Gráfico 40 B), e no tempo de imobilidade ($F_{(8,89)} = 6,776$; $p \leq 0,0001$; Gráfico 40 C).

O teste de Newman-Keuls revelou que as proles de ratos adultos nascidas de mães expostas ao EtOH+MeHg, não apresentaram comportamento do tipo depressivo. Entretanto, o tratamento crônico com o EE da *C. paludosa* apresentou um comportamento do tipo antidepressivo comparado ao grupo controle, resultando no aumento do tempo de subida (Gráfico 40 A) e uma redução significativa no tempo de imobilidade (Gráfico 40 C) no teste do nado forçado.

Além disso, o teste indicou uma diferença significativa no tempo de nado das proles adultas expostas ao EtOH+MeHg, que receberam o tratamento crônico com o EE da *C. paludosa* na dose de 1 mg/kg (Gráfico 40 A). Foi observado também que com a dose de 100 mg/kg (Gráfico 40 B), houve um aumento no tempo de nado, enquanto nas três doses do extrato observou-se uma redução do tempo de imobilidade (Gráfico 40 C).

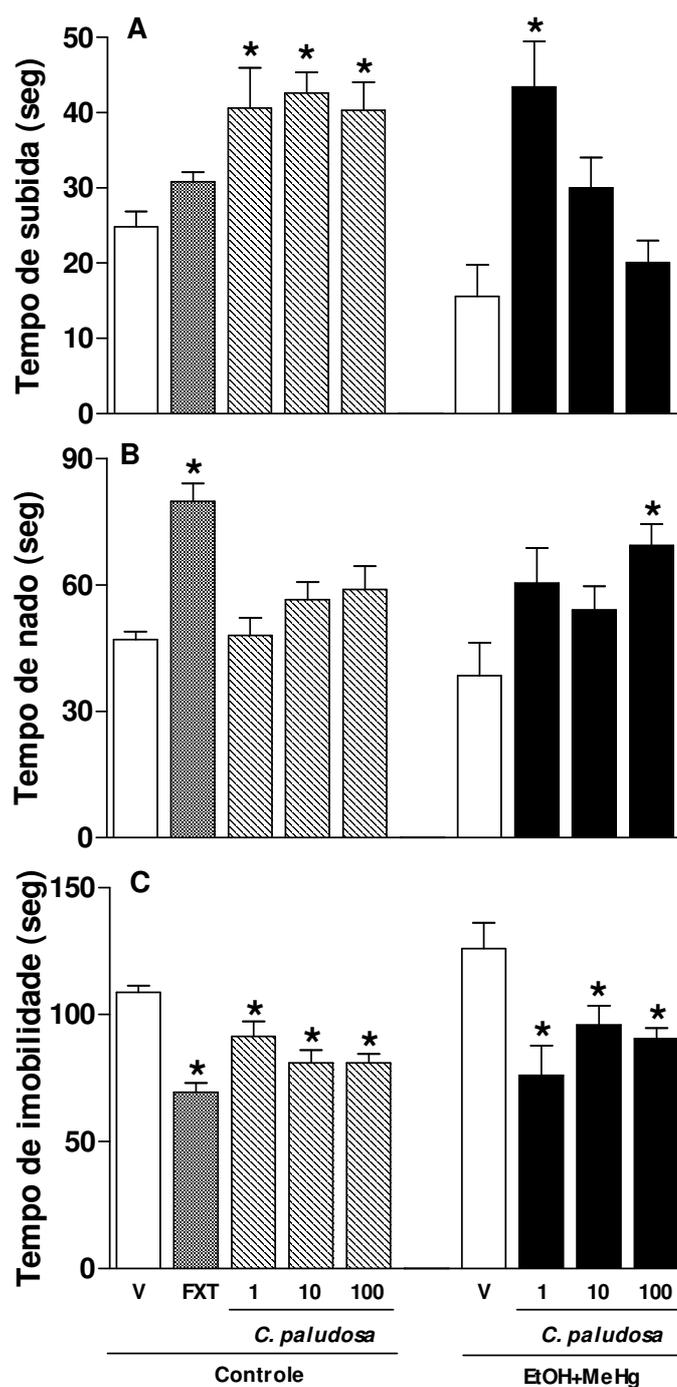


Gráfico 40: Efeito da administração crônica do EE da *C. paludosa* (1, 10 ou 100 mg/kg, v.o.) ou veículo (V) no tempo de subida (A), no tempo de nado (B) e no tempo de imobilidade (C) de proles adultas de ratas expostas ao EtOH+MeHg durante o período gestacional e lactacional avaliados no teste do nado forçado durante 3 min. FXT (10 mg/Kg, v.o.) foi utilizado como controle positivo. Os resultados são expressos como a média \pm E.P.M. de 10 animais por grupo. * $p < 0,05$ difere significativamente quando comparado ao tratamento com veículo do mesmo grupo. # $p < 0,05$ difere significativamente quando comparado ao tratamento com veículo do grupo controle (Teste de Newman-Keuls). FXT=fluoxetina.

3.4. Testes de memória

- Reconhecimento social

O gráfico mostra os resultados do tratamento crônico da administração oral do EE da *C. paludosa* (1, 10 ou 100 mg/kg), veículo (10 mL/kg) ou CAF (10 mg/kg, v.o., controle positivo) em proles adultas de ratas expostas ao EtOH+MeHg, durante o período gestacional e lactacional, na memória de reconhecimento social de ratos, quando o mesmo rato jovem foi re-exposto depois de um período de 30 min da primeira exposição. A ANOVA de uma via revelou um efeito significativo para o tratamento ($F_{(17,179)}=50,72$; $p<0,0001$) no tempo de investigação durante a segunda apresentação do mesmo rato jovem (Gráfico 41).

O teste de Newman-Keuls mostrou que, nesse tempo, os ratos tratados com CAF ou com o EE da *C. paludosa* (1, 10 ou 100 mg/kg) apresentaram uma redução significativa no tempo de investigação durante a segunda apresentação do rato jovem familiar, sugerindo um efeito facilitador da memória social e este efeito se manteve nos animais expostos prenatalmente aos neurotóxicos e tratados cronicamente com as doses de 10 ou 100 mg/kg do EE da *C. paludosa*. Por outro lado, os animais do grupo do EtOH+MeHg e EtOH+MeHg mais o EE na dose de 1 mg/kg, não foram capazes de reconhecer o rato jovem familiar no intervalo de tempo de 30 min.

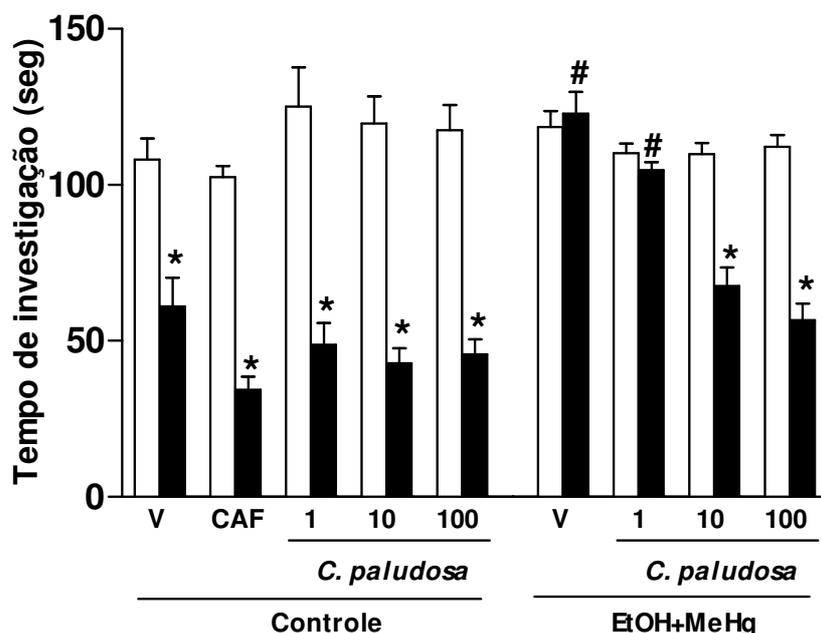


Gráfico 41: Efeito da administração crônica do EE da *C. paludosa* (1, 10 ou 100 mg/kg, v.o.), veículo (V) ou CAF (10 mg/kg, controle positivo, v.o.) no tempo de investigação social de ratos adultos, expostos ao EtOH+MeHg, durante o período gestacional e lactacional, quando o mesmo rato jovem foi re-exposto ao rato adulto, após um intervalo de 30 min da primeira apresentação. Os resultados são expressos como a média \pm E.P.M. de 10 animais por grupo. As barras representam o tempo de investigação na primeira (barras brancas) e segunda (barras pretas) apresentação. * $p < 0,05$ difere significativamente quando comparado à primeira apresentação do mesmo grupo. # $p < 0,05$ difere significativamente quando comparado à segunda apresentação do grupo controle tratado com o veículo (Teste de Newman-Keuls). CAF=caféina

O gráfico 42 mostra os resultados do tratamento crônico da administração oral do EE da *C. paludosa* (1, 10 ou 100 mg/kg), veículo (10 mL/kg) ou CAF (10 mg/kg, v.o., controle positivo), em proles adultas de ratas expostas ao EtOH+MeHg, durante o período gestacional e lactacional, na memória de reconhecimento social de ratos, após de um período de 120 min. A ANOVA de uma via revelou um efeito significante para o tratamento com o EE ($F_{(17,179)}=21,63$; $p < 0,0001$) no tempo de investigação durante a segunda apresentação do mesmo rato jovem familiar (Gráfico 42 A).

O teste de Newman-Keuls mostrou que, nesse tempo, os ratos tratados com CAF ou com o EE da *C. paludosa* (1, 10 ou 100 mg/kg) apresentaram,

conforme já demonstrado anteriormente, uma redução significativa no tempo de investigação durante a segunda apresentação do rato jovem familiar, sugerindo um efeito facilitador da memória social (Gráfico 42 A).

Ao contrário, as proles adultas do grupo do EtOH+MeHg não foram capazes de reconhecer o rato jovem durante a segunda apresentação, sugerindo assim, um déficit cognitivo. Tal comportamento foi revertido pelas três doses do EE da *C. paludosa* (Gráfico 42 A). Contudo, os resultados com o extrato da *C. paludosa* parecem ser específicos sobre a memória social de ratos adultos, uma vez que a redução no tempo de investigação não foi observada quando um rato jovem diferente daquele utilizado durante o primeiro encontro foi apresentado na segunda exposição (Gráfico 42 B).

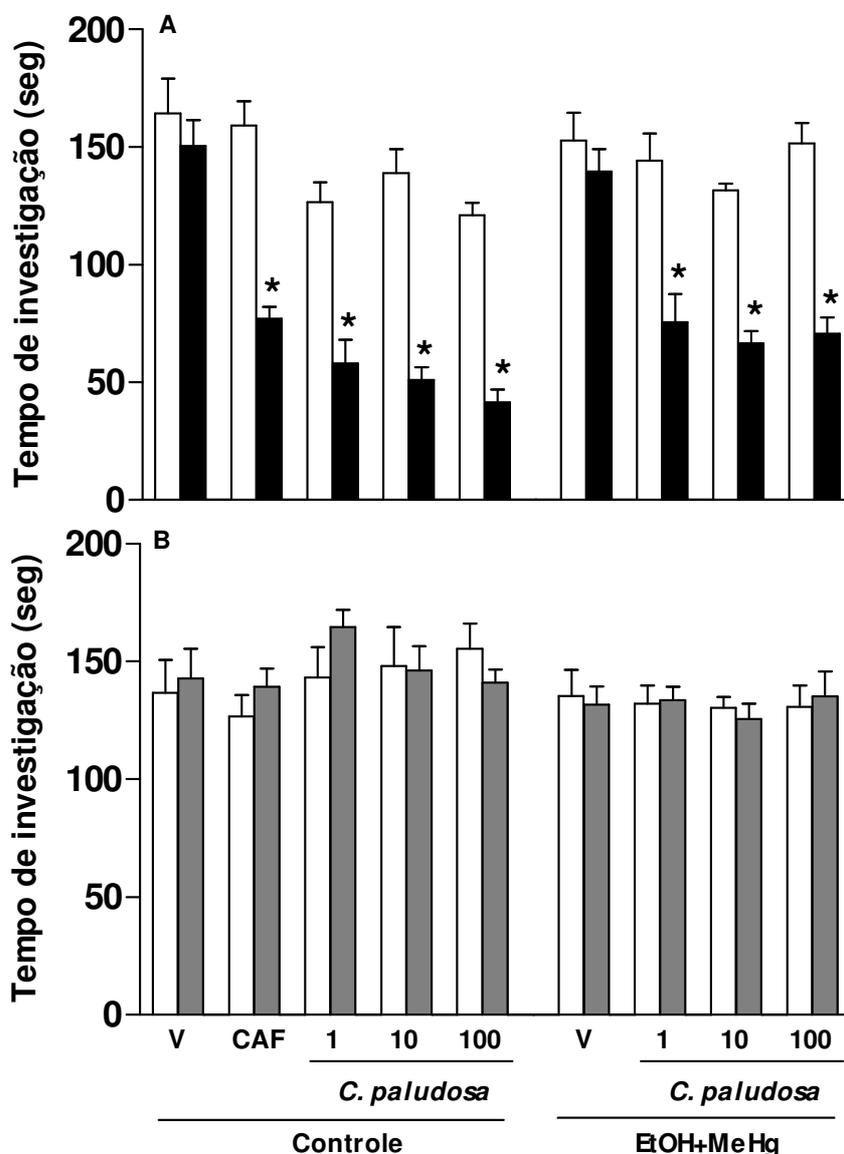


Gráfico 42: Efeito da administração crônica do EE da *C. paludosa* (1, 10 ou 100 mg/kg, v.o.), veículo (V) ou CAF (10 mg/kg, controle positivo, v.o.) no tempo de investigação social de ratos adultos, expostos ao EtOH+MeHg, durante o período gestacional e lactacional, quando o mesmo rato jovem (A) ou um rato jovem diferente (B) foi re-exposto ao rato adulto, após um intervalo de 120 min da primeira apresentação. Os resultados são expressos como a média \pm E.P.M. de 10 animais por grupo. As barras representam o tempo de investigação na primeira (barras brancas) e segunda (barras pretas ou cinzas) apresentação. * $p < 0,05$ difere significativamente quando comparado à primeira apresentação do mesmo grupo (Teste de Newman-Keuls). CAF=cafeína.

- Esquiva inibitória do tipo “step-down”

Os resultados do tratamento crônico da administração oral do EE da *C. paludosa* (1, 10 ou 100 mg/kg), veículo (10 mL/kg) ou CAF (10 mg/kg, v.o., controle positivo), em proles adultas de ratas expostas ao EtOH+MeHg, durante o período gestacional e lactacional, na memória espacial de curta e longa duração de ratos avaliados no teste da esquiva inibitória do tipo “step-down”, estão demonstrados no gráfico 43.

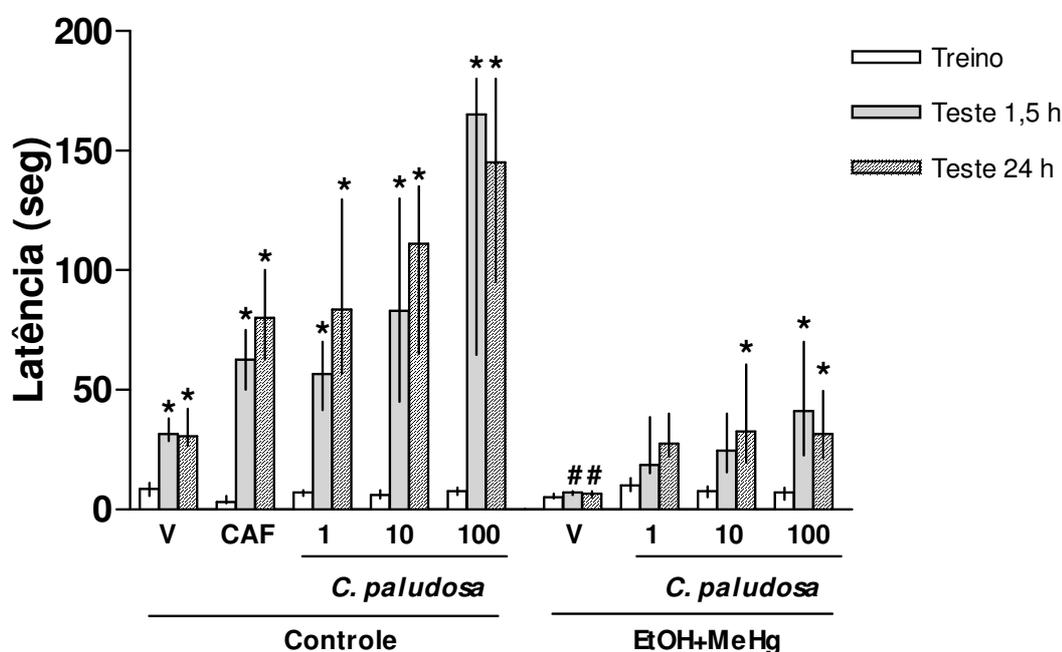


Gráfico 43: Efeito da administração crônica do EE da *C. paludosa* (1, 10 ou 100 mg/kg, v.o.), veículo (V) ou CAF (10 mg/kg, controle positivo, v.o.) na retenção da memória de curta (1,5 h) e longa duração (24 h) de ratos adultos expostos ao EtOH+MeHg, durante o período gestacional e lactacional, avaliados no teste da esquiva inibitória do tipo “step-down” (n=10 por grupo). Os dados estão expressos como as medianas (intervalo enterquartis) das latências de descida da plataforma nas sessões treino (barras brancas) e teste (1,5 h: barras cinzas; 24 h: barras hachuradas). * $p < 0,05$ difere significativamente quando comparado à respectiva sessão do grupo controle. # $p < 0,05$ difere significativamente quando comparado à respectiva sessão do grupo tratado (Teste de Mann-Whitney). CAF=cafeína.

O teste não paramétrico de Kruskal-Wallis revelou um efeito significativo para o tratamento na latência dos animais na memória de curta ($H(8, N=18)=151,4; p < 0,0001$) e longa duração ($H(8, N=18)=152,4; p < 0,0001$). O teste

de Mann-Whitney indicou que o tratamento com o EE da *C. paludosa* (1, 10 ou 100 mg/kg) e CAF (10 mg/kg), 60 min antes da sessão treino, aumentou significativamente a latência dos animais na memória de curta e longa duração, melhorando a memória espacial destes animais quando comparados aos animais controles tratados com o veículo. O teste mostrou também que os animais do grupo EtOH+MeHg apresentaram déficit cognitivos quando comparados aos animais tratados com o veículo do grupo controle. Este efeito foi revertido pelo tratamento com o EE da *C. paludosa* nas doses de 10 mg/kg (na sessão teste de 24 h) e na dose de 100 mg/kg (nas sessões testes de 1,5 h e 24 h).

3.5. Testes bioquímicos

3.5.1. Atividade de enzimas antioxidantes

- Catalase

O gráfico 44 mostra os resultados da atividade da catalase nos tecidos cerebrais em proles adultas de ratas expostas ao EtOH+MeHg, durante o período gestacional e lactacional, bem como o tratamento crônico da administração oral do EE da *C. paludosa* (1, 10 ou 100 mg/kg) ou veículo (10 mL/kg). A análise estatística realizada pela ANOVA de uma via indicou um efeito significativo para o tratamento nos tecidos cortical ($F_{(7,23)}=6,627$; $p=0,0053$) e hipocampal ($F_{(7,23)}=7,691$; $p=0,0004$), sem apresentar efeito significativo no tecido cerebelar ($F_{(7,23)}=0,7343$; $p=0,6466$). O teste de Newman-Keuls indicou que o EE da *C. paludosa* aumentou a atividade da catalase na dose de 100 mg/kg no tecido cortical dos animais controles (Gráfico 44 A) e nas dose de 10 e 100 mg/kg no tecido hipocampal (Gráfico 44 B).

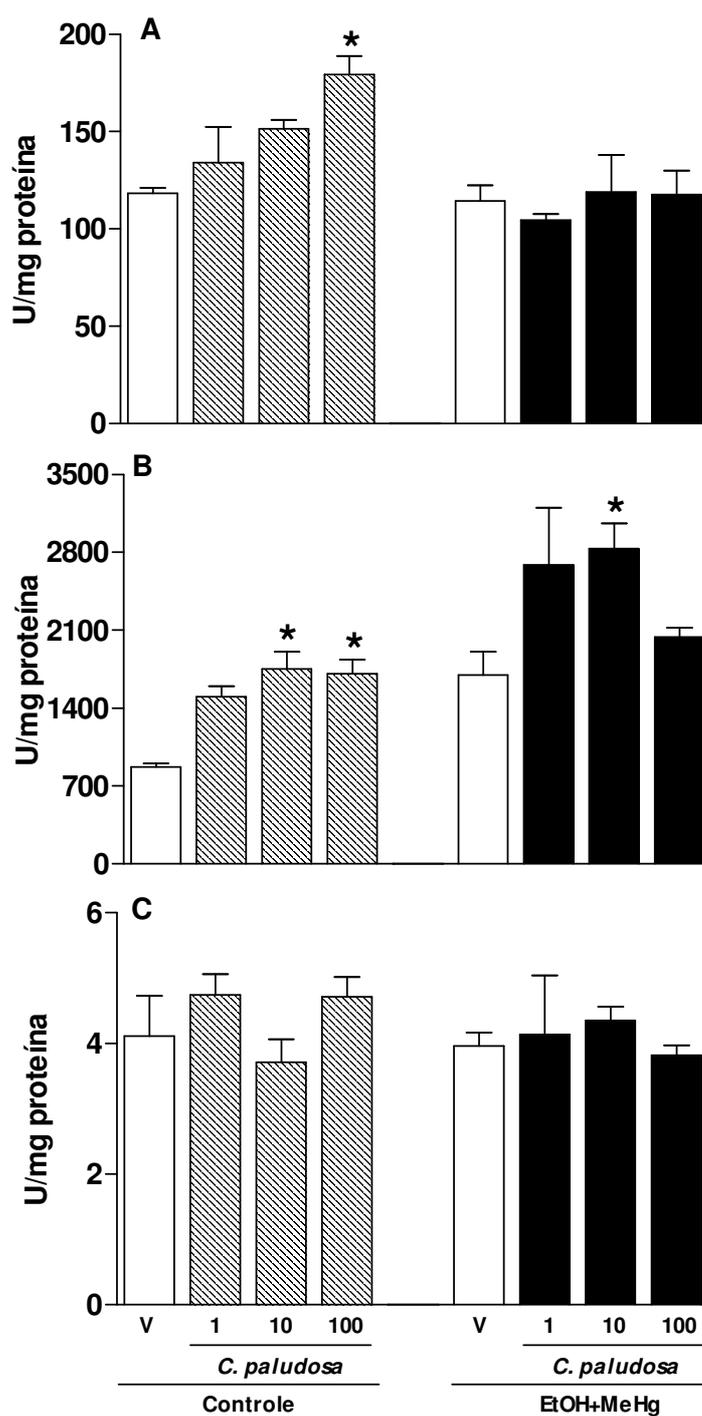


Gráfico 44: Efeito da administração crônica do EE da *C. paludosa* (1, 10 ou 100 mg/kg, v.o.) ou veículo (V) na atividade da catalase de tecidos cerebrais de proles adultas de ratas expostas ao EtOH+MeHg, durante o período gestacional e lactacional. Os resultados são expressos como a média \pm E.P.M. de 3 animais por grupo dos níveis da atividade da catalase nos tecidos cortical (A), hipocampal (B) e cerebelar (C). * $p < 0,05$ difere significativamente quando comparado ao tratamento com veículo do mesmo grupo (Teste de Newman-Keuls).

O gráfico 45 mostra os resultados da atividade da catalase no tecido de fígado de proles adultas de ratas expostas ao EtOH+MeHg, durante o período gestacional e lactacional, bem como o tratamento crônico da administração oral do EE da *C. paludosa* (1, 10 ou 100 mg/kg) ou veículo (10 mL/kg). A ANOVA de uma via indicou um efeito significativo para o tratamento ($F_{(7,23)}=5,437$; $p=0,0024$). O teste de Newman-Keuls indicou que o EE da *C. paludosa*, nas doses de 1 e 10 mg/kg, não aumentou a atividade da catalase nos animais controles e nas três doses nos animais do grupo do EtOH+MeHg. Além disso, o teste mostrou que o tratamento dos animais com o EtOH+MeHg, durante o período gestacional, inibiu a atividade da catalase nas proles adultas.

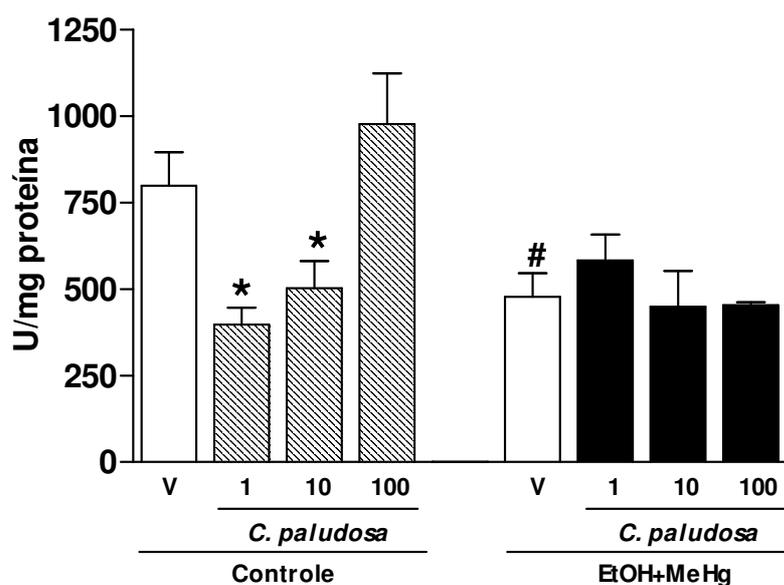


Gráfico 45: Efeito da administração crônica do EE da *C. paludosa* (1, 10 ou 100 mg/kg, v.o.) ou veículo (V) na atividade da catalase no tecido de fígado de proles adultas de ratas expostas ao EtOH+MeHg, durante o período gestacional e lactacional. Os resultados são expressos como a média \pm E.P.M. de 3 animais por grupo dos níveis da atividade da catalase nos tecidos cortical (A), hipocampal (B) e cerebelar (C). * $p<0,05$ difere significativamente quando comparado ao tratamento com veículo do mesmo grupo. # $p<0,05$ difere significativamente quando comparado à respectiva sessão do grupo tratado (Teste de Newman-Keuls).

- **Glutathiona peroxidase dependente de selênio**

O gráfico 46 mostra os resultados da atividade da Se-GPx nos tecidos cerebrais em proles adultas de ratas expostas ao EtOH+MeHg, durante o período gestacional e lactacional, bem como o tratamento crônico da administração oral do EE da *C. paludosa* (1, 10 ou 100 mg/kg) ou veículo (10 mL/kg). As análises estatísticas realizadas pela ANOVA de uma via indicou um efeito significativo para o tratamento nos tecidos cortical ($F_{(7,23)}=9,146$; $p=0,0001$), hipocampal ($F_{(7,23)}=8,394$; $p=0,0002$) e cerebelar ($F_{(7,23)}=6,250$; $p=0,0012$) (Gráfico 46 A, B e C), respectivamente.

O teste de Newman-Keuls indicou que o EE da *C. paludosa*, nas três doses, aumentou a atividade da Se-GPx no tecido cortical e cerebelar dos animais controles, sem alterar a atividade da enzima no tecido hipocampal (Gráfico 46 A, C e B), respectivamente. Esse mesmo efeito foi observado nas proles cujas mães foram expostas ao EtOH+MeHg, onde o EE da *C. paludosa*, na dose de 100 mg/kg, aumentou a atividade da Se-GPx no tecido hipocampal (Gráfico 46 B). No tecido cerebelar (Gráfico 46 C), a atividade da Se-GPx se mostrou reduzida diante das três doses, mas não de maneira significativa quando comparada aos animais controles.

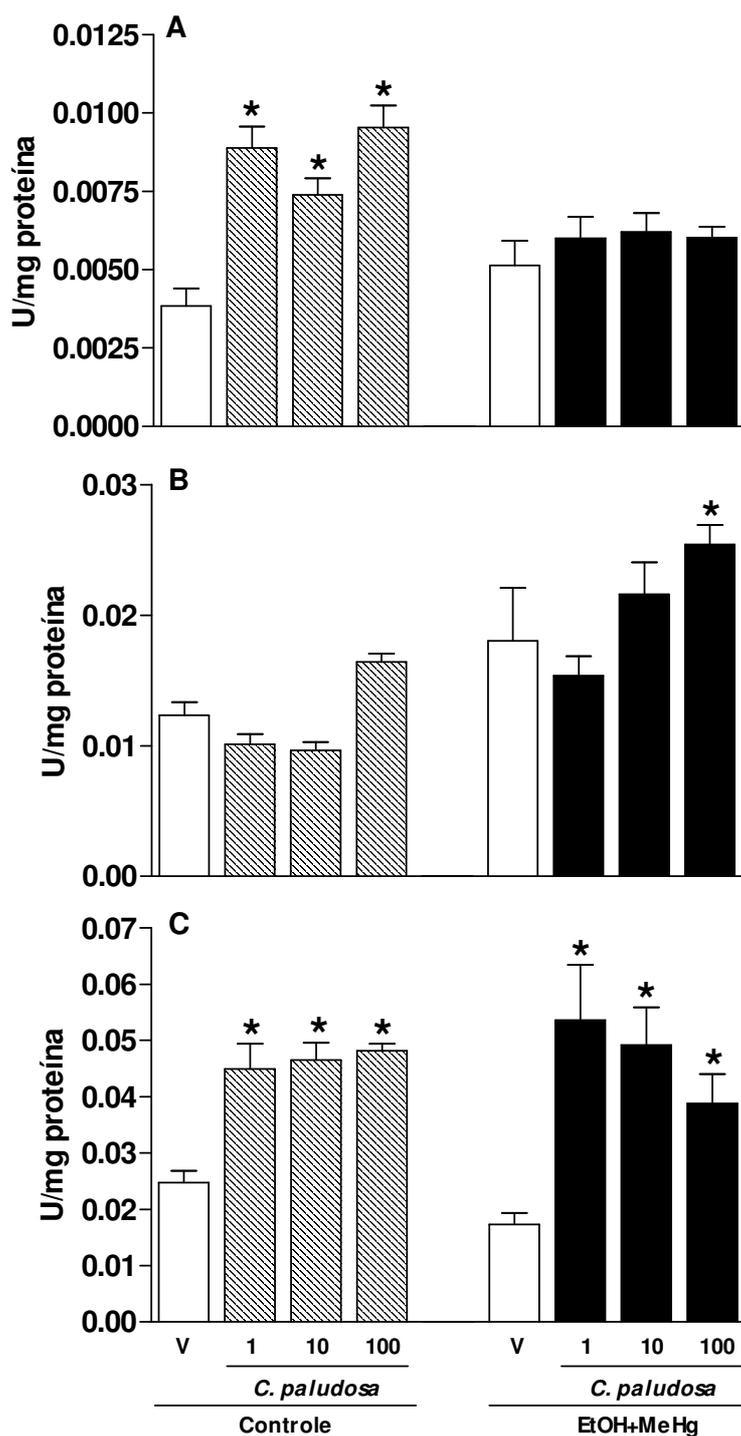


Gráfico 46: Efeito da administração crônica do EE da *C. paludosa* (1, 10 ou 100 mg/kg, v.o.) ou veículo (V) na atividade da glutatona peroxidase dependente de selênio em tecidos cerebrais de proles adultas de ratas expostas ao EtOH+MeHg, durante o período gestacional e lactacional. Os resultados são expressos como a média \pm E.P.M. de 3 animais por grupo dos níveis da atividade da catalase nos tecidos cortical (A), hipocampal (B) e cerebelar (C). * $p < 0,05$ difere significativamente quando comparado ao tratamento com veículo do mesmo grupo (Teste de Newman-Keuls).

O gráfico 47 mostra os resultados da atividade da Se-GPx no tecido de fígado de proles adultas de ratas expostas ao EtOH+MeHg, durante o período gestacional e lactacional, bem como o tratamento crônico da administração oral do EE da *C. paludosa* (1, 10 ou 100 mg/kg) ou veículo (10 mL/kg). A ANOVA de uma via não indicou qualquer efeito significativo para o tratamento ($F_{(7,23)}=0,8535$; $p=0,5613$).

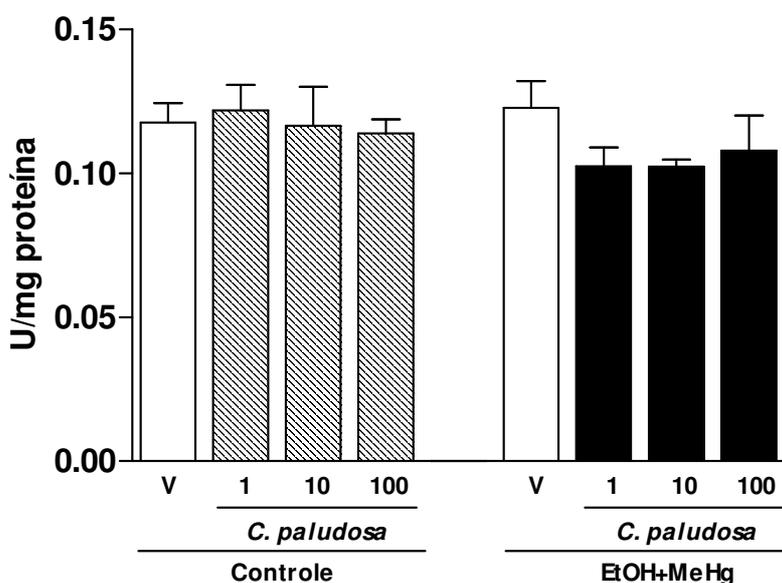


Gráfico 47: Efeito da administração crônica do EE da *C. paludosa* (1, 10 ou 100 mg/kg, v.o.) ou veículo (V) na atividade da glutatona peroxidase dependente de selênio, no tecido de fígado de proles adultas de ratas expostas ao EtOH+MeHg, durante o período gestacional e lactacional. Os resultados são expressos como a média \pm E.P.M. de 3 animais por grupo.

3.5.2. Indicadores de danos oxidativos

- Peroxidação lipídica pelo método de TBARS

O gráfico 48 mostra os resultados dos níveis de TBARS nos tecidos cerebrais de proles adultas de ratas expostas ao EtOH+MeHg, durante o período gestacional e lactacional, bem como o tratamento crônico da administração oral do EE da *C. paludosa* (1, 10 ou 100 mg/kg) ou veículo (10 mL/kg). As análises

estatísticas realizadas pela ANOVA de uma via indicaram um efeito significativo apenas para o tratamento no tecido cerebelar ($F_{(7,23)}=7,633$; $p=0,0004$) (Gráfico 48 C), sem alterar os níveis de TBARS no tecido cortical ($F_{(7,23)}=0,9377$; $p=0,5052$) (Gráfico 48 A) e no tecido hipocampal ($F_{(7,23)}=1,082$; $p=0,4189$) (Gráfico 48 B).

O teste de Newman-Keuls indicou que o tratamento com o EtOH+MeHg aumentou os níveis de TBARS no tecido cerebelar (Gráfico 48 C). Esse efeito de peroxidação lipídica foi revertido pelo tratamento dos animais com as três doses do EE da *C. paludosa*.

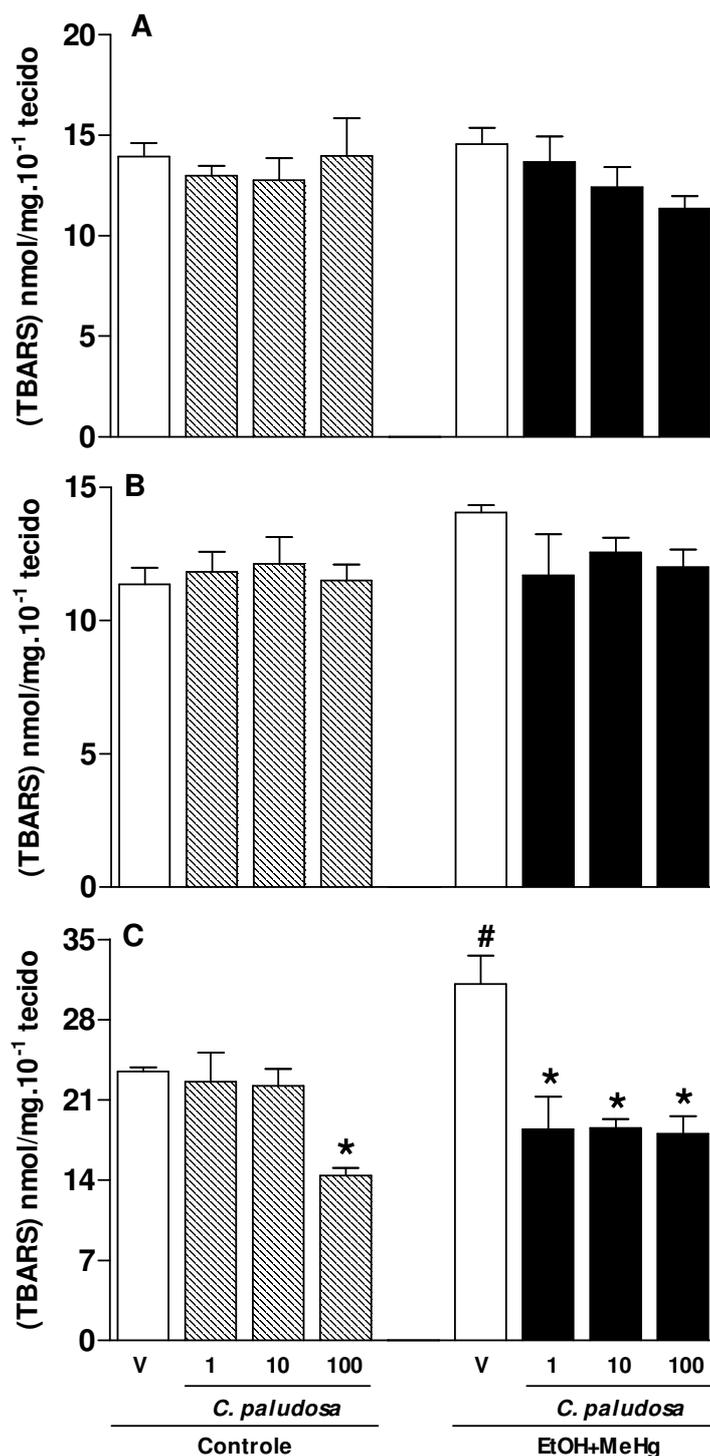


Gráfico 48: Efeito da administração crônica do EE da *C. paludosa* (1, 10 ou 100 mg/kg, v.o.) ou veículo (V) na peroxidação lipídica em tecidos cerebrais de proles adultas de ratas expostas ao EtOH+MeHg, durante o período gestacional e lactacional. Os resultados são expressos como a média \pm E.P.M. de 3 animais por grupo dos níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) nos tecidos cortical (A), hipocampal (B) e cerebelar (C). * $p < 0,05$ difere significativamente quando comparado ao tratamento com veículo do mesmo grupo. # $p < 0,05$ difere significativamente quando comparado ao tratamento com veículo do grupo controle (Teste de Newman-Keuls).

O gráfico 49 mostra os resultados dos níveis de TBARS no tecido de fígado proles adultas expostas ao EtOH+MeHg, durante o período gestacional e lactacional, bem como o tratamento crônico da administração oral do EE da *C. paludosa* (1, 10 ou 100 mg/kg) ou veículo (10 mL/kg). A análise estatística realizada pela ANOVA de uma via indicou um efeito significativo para o tratamento ($F_{(7,23)}=43,74$; $p<0,0001$).

O teste de Newman-Keuls indicou que os tratamentos com as três doses do EE da *C. paludosa* diminuíram os níveis de peroxidação lipídica. Esse efeito também foi observado nos animais do grupo EtOH+MeHg, mantendo-se constantes nos animais expostos aos neurotóxicos e tratados com o EE.

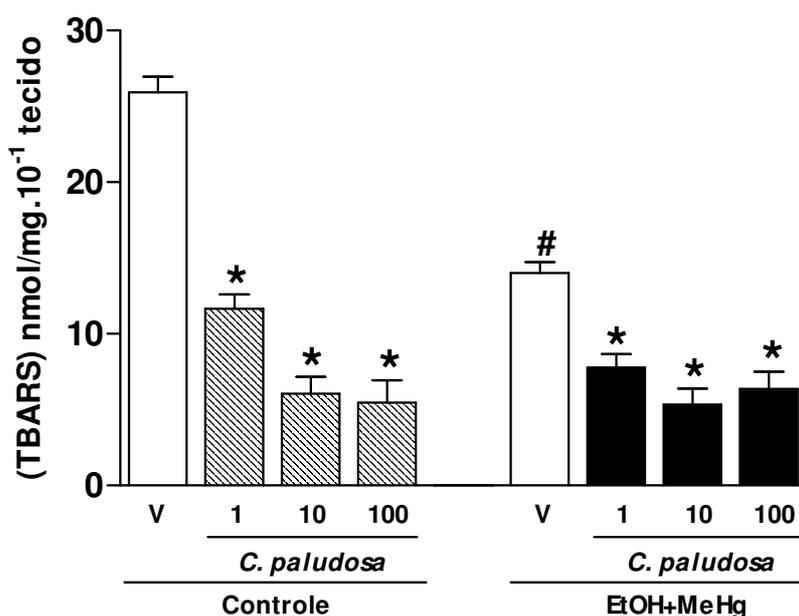


Gráfico 49: Efeito da administração crônica do EE da *C. paludosa* (1, 10 ou 100 mg/kg, v.o.) ou veículo (V) na peroxidação lipídica em tecido de fígado de proles adultas de ratos expostas ao EtOH+MeHg, durante o período gestacional e lactacional. Os resultados são expressos como a média \pm E.P.M. de 3 animais por grupo dos níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). * $p<0,05$ difere significativamente quando comparado ao tratamento com veículo do mesmo grupo. # $p<0,05$ difere significativamente quando comparado ao tratamento com veículo do grupo controle (Teste de Newman-Keuls).

- **Peroxidação lipídica pelo método de alaranjado de xilenol**

O gráfico 50 mostra a concentração de equivalentes de hidroperóxido de cumeno nos tecidos cerebrais de proles adultas de ratas expostas ao EtOH+MeHg, durante o período gestacional e lactacional, bem como o tratamento crônico da administração oral do EE da *C. paludosa* (1, 10 ou 100 mg/kg) ou veículo (10 mL/kg). A ANOVA de uma via indicou um efeito significativo para o tratamento com o EE no tecido cortical ($F_{(7,23)}=8,685$; $p<0,0002$), hipocampal ($F_{(7,23)}=3,327$; $p<0,0220$) e cerebelar ($F_{(7,23)}=5,837$; $p<0,0017$) (Gráfico 50 A, B e C), respectivamente.

O teste de Newman-Keuls indicou que o tratamento com o EtOH+MeHg não apresentou diferença significativa nas concentração de equivalentes de hidroperóxido de cumeno nos tecidos cerebrais. Entretanto, o teste indicou que a dose de 100 mg/kg do EE diminuiu a concentração de equivalentes de hidroperóxido de cumeno nos animais tratados com os neurotóxicantes no tecido cortical (Gráfico 50 A) e no tecido hipocampal (Gráfico 50 B).

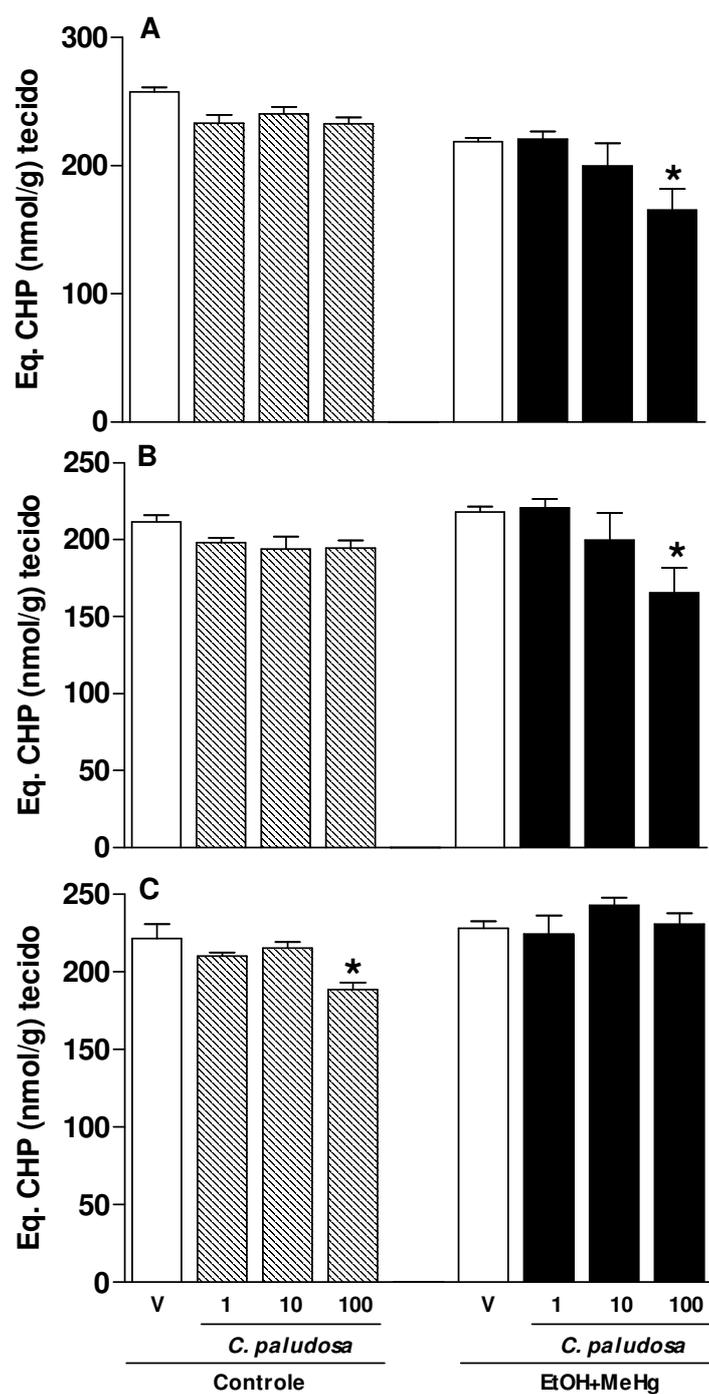


Gráfico 50: Efeito da administração crônica do EE da *C. paludosa* (1, 10 ou 100 mg/kg, v.o.) ou veículo (V) na concentração de equivalentes de hidroperóxido de cumeno (Eq. CHP) nos tecidos cerebrais de proles adultas de ratas expostas ao EtOH+MeHg, durante o período gestacional e lactacional. Os resultados são expressos como a média ± E.P.M. de 3 animais por grupo dos níveis de Eq. CHP nos tecidos cortical (A), hipocampal (B) e cerebelar (C). * $p < 0,05$ difere significativamente quando comparado ao tratamento com veículo do mesmo grupo. # $p < 0,05$ difere significativamente quando comparado ao tratamento com veículo do grupo controle (Teste de Newman-Keuls).

O gráfico 51 mostra a concentração de equivalentes de hidroperóxido de cumeno no tecido de fígado de proles adultas de ratas expostas ao EtOH+MeHg durante o período gestacional e lactacional, bem como o tratamento crônico da administração oral do EE da *C. paludosa* (1, 10 ou 100 mg/kg) ou veículo (10 mL/kg). A ANOVA de uma via indicou um efeito significativo para o tratamento no tecido ($F_{(7,23)}=254,3$; $p<0,0001$).

O teste de Newman-Keuls indicou que os tratamentos com as três doses do EE diminuiu a concentração de equivalentes de hidroperóxido de cumeno, quando comparados ao grupo controle, confirmando os resultados do teste de TBARS. O teste também indicou que tratamento com o EtOH+MeHg diminuiu a concentração de equivalentes de hidroperóxido de cumeno no tecido, e que esta foi diminuída pelo tratamento com as três doses do EE da *C. paludosa*.

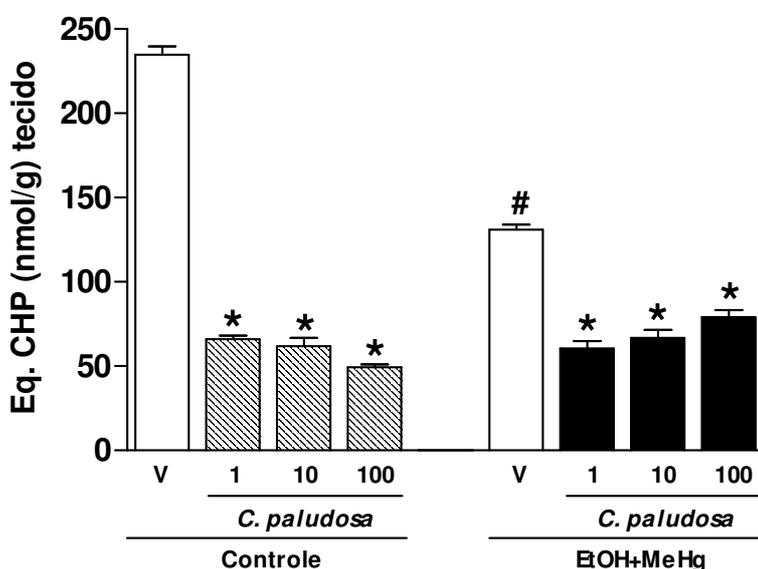


Gráfico 51: Efeito da administração crônica do EE da *C. paludosa* (1, 10 ou 100 mg/kg, v.o.) ou veículo (V) na concentração de equivalentes de hidroperóxido de cumeno (Eq. CHP) no tecido de fígado de proles adultas de ratas expostas ao EtOH+MeHg, durante o período gestacional e lactacional. Os resultados são expressos como a média \pm E.P.M. de 3 animais. * $p<0,05$ difere significativamente quando comparado ao tratamento com veículo do mesmo grupo. # $p<0,05$ difere significativamente quando comparado ao tratamento com veículo do grupo controle (Teste de Newman-Keuls).

4. DISCUSSÃO

Os resultados obtidos no presente estudo, confirmam estudos prévios do nosso laboratório (Maia e cols., 2009a), demonstrando que a associação do tratamento prenatal com o EtOH (6,5 g/kg) com uma única dose de MeHg (8 mg/kg), administrada no 15º dia de gestação, resulta em respostas neurocomportamentais nas proles adultas. O tratamento crônico com o EE obtido a partir dos bulbos da *C. paludosa* nas doses de 1, 10 ou 100 mg/kg, por v.o., atenuou os déficits emocionais e cognitivos induzidos pela exposição prenatal ao EtOH+MeHg em ratos.

A exposição prenatal ao EtOH e/ou MeHg provoca um amplo espectro de sequelas no SNC acarretando em diversos efeitos comportamentais. Vários estudos relatam déficits cognitivos decorrentes da exposição prenatal ao EtOH e/ou MeHg em humanos (Bailey e Sokol, 2008; Burden e cols., 2005; Mendola e cols., 2002; Murata e cols., 2004; Streissguth e cols., 1990) e em animais (Barbaccia e cols., 2007; Carratù e cols., 2008; Dursun e cols., 2006; Maia e cols., 2009a; Onishchenko e cols., 2008).

No presente estudo, ratos machos adultos expostos ao EtOH e MeHg, durante o período gestacional e lactacional, apresentaram um claro desenvolvimento de um comportamento do tipo ansiogênico, como indicado pela redução da frequência do tempo gasto nos braços abertos do LCE. O tratamento crônico com o EE da *C. paludosa* (1, 10 ou 100 mg/kg, v.o.) reduziu esse comportamento induzido pela exposição prenatal ao EtOH+MeHg em ratos, como indicado por um significativo aumento no tempo permanecido nos braços abertos do LCE, sem alterar o número total de entradas nos braços fechados.

De acordo com os resultados anteriores, dados recentes de nosso grupo de pesquisa mostraram um efeito do tipo ansiogênico em proles adultas expostas ao EtOH+MeHg durante a fase intrauterina (Maia *e cols.*, 2009). Importante relatar que, no presente estudo, o tratamento crônico com o EE da *C. paludosa* (1, 10 ou 100 mg/lg, v.o.) reverteu o comportamento do tipo ansiogênico associado com a exposição prenatal ao EtOH+MeHg.

O interesse da atual pesquisa foi também analisar os efeitos da exposição prenatal ao EtOH+MeHg no comportamento do tipo depressivo, um tópico pouco abordado em estudos anteriores. Foi utilizado o teste do nado forçado, considerado como um modelo animal de depressão (Porsolt *e cols.*, 1978). Nesse teste, diferente dos animais tratados prenatalmente apenas com MeHg, os ratos adultos expostos prenatalmente ao EtOH+MeHg não apresentaram comportamento do tipo depressivo. Corroborando com esses dados, Maia *e cols.*, (2009a) demonstraram que a administração combinada dos dois neurotóxicos não interferiu no comportamento avaliado no teste do nado forçado, quando comparado aos animais do grupo controle.

As síndromes depressivas têm sido relatadas em humanos que tiveram uma exposição ocupacional ao mercúrio inorgânico (Grum *e cols.*, 2006), mas nada se tem de relato sobre o efeito da administração combinada do EtOH com o MeHg.

Espécies da família Iridaceae têm sido estudadas por suas propriedades antioxidantes e efeitos benéficos em modelos de aprendizado e memória (Boskabady e Aslani, 2006; Papandreou *e cols.*, 2006; Pitsikas *e cols.*, 2007; Pitsikas e Sakellaridis, 2006). Entretanto, não há dados na literatura mostrando

essas propriedades em modelos animais de exposição combinada aos neurotóxicos.

Para se avaliar o efeito da administração combinada do EtOH e MeHg em comportamentos mnemônicos, foram realizados dois testes para avaliar a cognição dos animais expostos EtOH+MeHg e tratados cronicamente com o EE da *C. paludosa* (1, 10 ou 100 mg/kg, v.o.). Os testes avaliados foram o de reconhecimento social e esQUIVA inibitória do tipo “*step-down*”, conforme já explicados em capítulos anteriores.

Nos testes de memória social, os dados do presente estudo mostraram um efeito facilitador da memória em ratos tratados cronicamente com o EE da *C. paludosa*, apresentando uma melhora na capacidade de reconhecer um rato jovem, quando este foi re-exposto ao rato adulto, após um período de 120 min da primeira apresentação. Este resultado sugere um efeito facilitador do EE na MCD dos animais. Esse efeito se manteve constante quando um rato jovem diferente foi re-apresentado ao rato adulto após o mesmo intervalo de tempo. Esse comportamento facilitador da memória não foi observado nos animais do grupo do EtOH+MeHg.

Os resultados mostraram que os animais expostos prenatalmente ao EtOH+MeHg apresentaram um prejuízo na capacidade de reconhecer um rato jovem, quando re-exposto ao rato adulto, após um curto intervalo de tempo de 30 min, sugerindo um prejuízo na memória social. Importante relatar que esse efeito prejudicial na memória social dos animais foi revertido pelo tratamento com o EE da *C. paludosa*.

Os resultados presentes neste estudo estão de acordo com dados da literatura, indicando que a exposição prenatal ao EtOH+MeHg pode acarretar a déficits cognitivos afetando áreas cerebrais envolvidas em processos mnemônicos (Maia e cols., 2009, 2010). Contudo, esses dados são os pioneiros mostrando o efeito da exposição prenatal ao EtOH+MeHg no modelo de memória social.

A memória espacial foi avaliada no teste da esQUIVA inibitória do tipo “*step-down*”. Os resultados presentes neste estudo demonstraram que o tratamento com todas as doses do EE da *C. paludosa* apresentou um efeito facilitador na retenção da memória de curta e longa duração, quando comparado aos animais do grupo controle. Este efeito facilitatório do EE foi dissociado de qualquer efeito sedativo ou relaxante inespecífico, como foi comprovado pelo teste de campo aberto realizado nos animais. Entretanto, as proles adultas expostas prenatalmente ao EtOH+MeHg apresentaram déficits na memória espacial.

Estes resultados estão de acordo com trabalhos prévios do nosso grupo que mostram déficits cognitivos na memória espacial de ratos expostos prenatalmente ao EtOH+MeHg (Maia e cols., 2009a). Importante ressaltar que o tratamento com o EE da *C. paludosa* reverteu o déficit cognitivo induzido pela exposição prenatal ao EtOH+MeHg.

Além dos testes comportamentais, o presente estudo mostrou uma diminuição significativa na atividade da catalase no tecido de fígado de ratos adultos expostos prenatalmente ao EtOH+MeHg. Os níveis de Se-GPx dos animais do grupo dos neurotóxicantes não apresentaram diferença significativa em relação ao controle. Entretanto, o tratamento com o EE da *C. paludosa* (1, 10

ou 100 mg/kg, v.o.) induziu os níveis de Se-GPx no tecido cerebelar, nos animais tratados prenatalmente com EtOH+MeHg. Este resultado pode ser explicado como um mecanismo compensatório do próprio organismo destes animais.

O cérebro é conhecido por ser susceptível ao dano oxidativo, em função da alta utilização de oxigênio e dos altos níveis de lipídios não saturados e metais de transição como ferro, além, dos mecanismos deficientes em defesa antioxidativa (Reiter, 1995). Além disso, as EROs e a peroxidação lipídica têm sido implicadas na patogênese de desordens neurológicas incluindo trauma cerebral, isquemia e doenças neurodegenerativas, como Parkinson e Alzheimer (Halliwell, 1992). Assim, agentes farmacológicos são capazes de eliminar radicais livres e/ou inibir a peroxidação lipídica (Dornas *e cols.*, 2007) e, desta maneira, proteger neurônios de danos oxidativos, podendo prover completo uso na prevenção ou tratamento de desordens neurodegenerativas causadas por estresse oxidativo.

Além das medidas das enzimas antioxidantes catalase e Se-GPx, o presente estudo mediu os níveis de peroxidação lipídica em tecidos cerebrais e dos fígados de ratos adultos expostos ao EtOH+MeHg, durante o período gestacional e lactacional. Para a determinação dos níveis de peroxidação lipídica foram utilizadas duas metodologias: TBARS e alaranjado de xilenol, conforme já explicado anteriormente.

Os dados presentes mostraram um aumento nos níveis de TBARS no tecido cerebelar de ratos adultos expostos prenatalmente ao EtOH+MeHg. Este efeito foi revertido pelo tratamento crônico com todas as doses do EE da *C. paludosa*, sugerindo um efeito protetor do EE. No tecido de fígado o tratamento

com o EtOH+MeHg não induziu a peroxidação lipídica, quando avaliado tanto pelo método de TBARS, quanto pelo método de alaranjado de xilenol.

5. CONCLUSÕES PARCIAIS

Em conjunto, o presente estudo mostrou que a exposição prenatal ao EtOH+MeHg produz, a longo prazo, alterações comportamentais do tipo ansiogênicas, déficits cognitivos e alterações nos parâmetros oxidantes em tecido cerebelar de proles adultas de ratos. Esses resultados reforçam que a exposição prenatal aos neurotóxicos como o EtOH e MeHg, durante o desenvolvimento do SNC, é um possível fator de risco para o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas. Além disso, os dados deste estudo sugerem que o EE da *C. paludosa* pode representar uma fonte de recurso terapêutico para déficits cognitivos produzidos pela exposição prenatal ao EtOH+MeHg.

III. DISCUSSÃO GERAL

Os resultados apresentados neste trabalho demonstram, pela primeira vez, estudos farmacológicos realizados com os EE da *C. paludosa* (Iridaceae), administrados de forma aguda ou crônica (14 dias), em modelos de comportamentos de ansiedade, depressão e memória, em ratos adultos.

Kessler *e cols.* (1994, 2005) relataram que a ansiedade é considerada uma das doenças psíquicas mais comuns nas populações. As plantas têm sido usadas pelos humanos, desde tempos imemoriais, para curar e aliviar uma variedade de doenças que envolvem o SNC. Além disso, a pesquisa de novos fármacos, a partir de plantas medicinais usadas para tratar doenças psiquiátricas, tem avançado significativamente (Araujo *e cols.*, 2008; DeKosky e Furberg, 2008; Potterat e Hamburger, 2008; Williamson *e cols.*, 2008).

No presente estudo foi demonstrado que o tratamento crônico com o EE da *C. paludosa*, nas doses de 1, 10 ou 100 mg/kg, apresentou um efeito do tipo ansiolítico e antidepressivo em ratos adultos, avaliados no modelo do LCE e nado forçado, respectivamente. Estes resultados com o EE sugerem um possível envolvimento com os sistemas serotoninérgico e/ou colinérgico, visto que estes estão intimamente relacionados com os comportamentos do tipo ansiolítico e/ou antidepressivo.

A literatura também tem relatado um crescente número de pesquisas envolvendo o uso de plantas medicinais e seus compostos em distúrbios cognitivos (Bhutada *e cols.*, 2010; Chonpathompikunlert *e cols.*, 2010; Prediger *e cols.*, 2008). Espécies da família Iridaceae têm sido relatadas por apresentarem propriedades antioxidantes e efeitos inibitórios na agregação das proteínas beta-amilóides que podem influenciar, de alguma forma, os aspectos cognitivos

(Boskabady e Aslani, 2006; Papandreou e cols., 2006; Pitsikas e cols., 2007; Sallem e cols., 2006). Em decorrência disso, nossos resultados representam um avanço em direção aos melhores entendimentos dos efeitos centrais da espécie *C. paludosa*.

Investigando o aspecto anterior, nesta pesquisa o EE da *C. paludosa* apresentou efeito facilitador da memória em ratos adultos, quando avaliados nos testes de reconhecimento social e esQUIVA inibitória do tipo “*step-down*”. Este efeito foi descartado de qualquer efeito inespecífico do EE, visto que nenhuma alteração significativa na locomoção dos animais foi observada no teste do campo aberto.

O EE da *C. paludosa*, quando administrado agudamente (1h antes dos ensaios comportamentais), apresentou significativo efeito facilitador da memória em ratos e camundongos, nos dois modelos experimentais, acima citados, onde se observou que esses efeitos foram modulados pelo sistema adenosinérgico, via os receptores A_1 e A_{2A} .

O sistema adenosinérgico, conforme já relatado no capítulo 1, exerce um papel neuromodulador fundamental para os processos de aprendizagem e memória. Este, uma vez ativado, produz inibição e facilitação da liberação de neurotransmissores, tais como receptores A_1 e A_{2A} , de alta importância fisiológica (Cunha, 2001; Sebastião e Ribeiro, 2000).

Demonstrou-se também um efeito semelhante do EE em facilitar a memória de camundongos, quando eles foram administrados agudamente com as duas naftoquinonas isoladas da referida espécie: eleuterina e isoeleuterina. Contudo, estas não parecem ser as substâncias majoritárias responsáveis pelo

efeito facilitador da memória do EE da *C. paludosa*, uma vez que as doses efetivas avaliadas foram muito próximas das doses do EE.

As naftoquinonas são compostos metabólicos encontrados em várias partes vegetativas de plantas superiores, algas, fungos, e como subproduto do metabolismo de algumas bactérias. Estudos mostram a presença de naftoquinonas, como eleuterina e isoeleuterina (Alves *et cols.*, 2003; Hara *et cols.*, 1997), bem com derivados como hongconin (Zhengxiong *et cols.*, 1984), em bulbos de espécies da família Iridaceae.

Algumas naftoquinonas são antibacterianas (Ifesam *et cols.*, 2009; Mahabusarakam *et cols.*, 2010) e fungicidas (Alves *et cols.*, 2003; Kusuma *et cols.*, 2010), outras apresentam atividades antiprotozoárias (Bourguignon *et cols.*, 2010), antivirais (Hong *et cols.*, 2008; Takegami *et cols.*, 1998) e antitumorais (Itoigawa *et cols.*, 2001; Kongkathip *et cols.*, 2010). Até o presente momento, não há dados na literatura sobre a ação de naftoquinonas em modelos animais de memória ou aprendizado.

Nossos resultados também demonstraram que os efeitos facilitatórios da memória em ratos adultos, decorrentes da administração aguda com o EE da *C. paludosa*, na dose de 100 mg/kg, puderam ser modulados pelos sistemas colinérgico, glutamatérgico e nitrérgico (dados não publicados). Estudos fitoquímicos estão em processo de purificação e identificação de outros compostos presentes na espécie estudada, que podem ser responsáveis por estas propriedades envolvidas com processos cognitivos.

No que diz respeito à proteção central contra os efeitos deletérios dos neurotóxicos, o EE dos bulbos da *C. paludosa*, administrado cronicamente nas

doses de 1, 10 ou 100 mg/Kg, apresentou efeito do tipo ansiolítico e antidepressivo em ratos adultos, sem apresentar qualquer tipo de alteração locomotora. Os efeitos do EE foram comparados ao DZP, FXT ou CAF. Essas propriedades foram capazes de prevenir os déficits comportamentais decorrentes da exposição ao EtOH e/ou MeHg nos modelos avaliados, como o LCE e nado forçado.

A avaliação da provável atividade ansiolítica do EE da *C. paludosa*, e seus efeitos contra o efeito ansiogênico produzido pelos neurotóxicos, foram avaliados fazendo-se uso do teste do LCE. De acordo com Pellow *e cols.* (1985) e Berrett (1991) um efeito ansiolítico é sugerido quando a droga aumenta a %EBA naquele labirinto, sem alterar o número total de EBF. Drogas ansiolíticas como o DZP, aumentam a % EBA e % TBA no teste do LCE, enquanto drogas ansiogênicas têm efeitos opostos (File, 1992). Os efeitos decorrentes do tratamento crônico na %EBA e %TBA foram similares aos efeitos do DZP, droga ansiolítica de referência. Esses resultados sugerem a presença de uma atividade ansiolítica nos bulbos da *C. paludosa*.

Em prévio estudo, Maia *e cols.* (2009a) mostraram que, no teste do LCE, o grupo EtOH mostrou um comportamento relacionado à ansiedade (baixas %EBA e %TBA) em comparação aos grupos controles. Uma resposta similar foi observada pelo grupo MeHg. Esses resultados parecem demonstrar um efeito específico relacionado à ansiedade, visto que a EBF não foi afetada pelo tratamento, seja com EtOH ou MeHg.

Como discutido por File (1992), a EBF é uma medida de atividade geral neste teste, apropriada para indicar se uma droga é ansiolítica ou ansiogênica.

Nossos dados confirmam os dados de outros estudos mostrando que o efeito ansiogênico pode ser produzido pela exposição de longa duração do EtOH (da Silva *e cols.*, 2004). Além disso, a exposição combinada do EtOH+MeHg, em ratas grávidas, mostrou um efeito ansiogênico significativo nas proles adultas.

Decidiu-se também investigar o processo pelo qual pode ocorrer a depressão durante a interferência desses neurotóxicos. Ratos que são forçados a nadarem, em uma área restrita, assumem uma postura imóvel após a tentativa inicial de escape, mantendo somente os movimentos mínimos necessários para manter a cabeça acima da água. (Porsolt *e cols.*, 1978). Relatos prévios têm mostrado que o nado “é sensível” aos componentes serotoninérgicos, tais como os inibidores de recaptção de serotonina, como a FXT (Cryan e Lucki 2000; Detke *e cols.*, 1995; Holick *e cols.*, 2008; Nakatomi *e cols.*, 2008).

Dados deste estudo, usando o teste do nado forçado, demonstraram que o EE da *C. paludosa*, quando administrado cronicamente, produziu uma resposta antidepressiva em animais, quando comparada à FXT. Alguns extratos ou princípios ativos obtidos a partir de espécies pertencentes à família Iridaceae têm um amplo espectro de atividades biológicas, incluindo efeitos antidepressivos (Akhondzadeh *e cols.*, 2004, 2005; Akhondzadeh Basti *e cols.*, 2007; Moshiri *e cols.*, 2006; Noorbala *e cols.*, 2005; Schmidt *e cols.*, 2007).

O tratamento crônico do EE nas doses de 1, 10 ou 100 mg/kg foi capaz de reduzir o tempo de imobilidade e aumentar os comportamentos ativos, como o de subida e nado, quando comparado ao grupo controle em que as proles foram tratadas com salina. Esses resultados estão de acordo com os dados para a

locomoção, nos quais somente o grupo MeHg reduziu a locomoção, o que pode estar relacionada ao alto nível de imobilidade.

Vários estudos demonstraram uma correlação entre os comportamentos de estresse, emoção e depressão (Abe *e cols.*, 2007; Sakakibara *e cols.*, 2005). O medo pode servir como um mecanismo adaptativo de alerta para o organismo e que também pode ser caracterizado por ansiedade e agitação (Delgado *e cols.*, 2006). Diferente dos resultados obtidos para o grupo MeHg, o grupo EtOH não mostrou qualquer diferença nos resultados da atividade locomotora e no teste do nado forçado, quando comparados ao controle. Esses achados são opostos aqueles mostrando que proles jovens e adultas de mães alimentadas com EtOH apresentaram uma alta atividade locomotora no teste do campo aberto (Bond e Di Giusto, 1977; Riley *e cols.*, 1986).

Em nossos experimentos foi utilizado EtOH 6,5 g/kg e não se observou qualquer diferença nos animais que receberam este neurotóxico, quando comparados aos animais controles. A diferença observada entre essa e outras pesquisas pode ser em decorrência dos modelos experimentais, espécies de animais usados e/ou a susceptibilidade aos efeitos teratogênicos do EtOH (Becker *e cols.*, 1996).

Em estudos anteriores, Lucena *e cols.* (2007b) demonstraram o EE da *C. paludosa* como um potencial agente em doenças neurológicas relacionadas à excitotoxicidade e ao estresse oxidativo. Tendo em vista os resultados do trabalho citado, o EE da *C. paludosa* foi testado no modelo da esQUIVA inibitória para avaliação de uma suposta atividade facilitatória da memória. No tratamento

crônico, todas as doses do EE apresentaram atividades mnemônicas em proles adultas de ratas, quando comparadas ao grupo controle.

Este efeito facilitatório pode ser observado tanto na retenção da MCD quanto na MLD e comparado à CAF utilizada como controle positivo em testes de memória (Perdiger *e cols.*, 2008). Este efeito do EE é dissociado de qualquer efeito sedativo ou relaxante inespecífico, como foi comprovado pelos resultados obtidos no teste de campo aberto.

Nos animais submetidos à intoxicação intrauterina de EtOH ou MeHg, o EE da *C. paludosa* (1, 10 ou 100 mg/kg) também mostrou efeito facilitatório da retenção da memória, quando comparado aos respectivos controles. No grupo associado aos dois neurotóxicos (EtOH+MeHg), o EE da *C. paludosa* mostrou efeito facilitatório apenas na dose de 100 mg/kg. Estudo recente (Maia *e cols.*, 2009a) demonstrou que a intoxicação intrauterina de EtOH+MeHg em ratas causa déficits de memória, no teste da esQUIVA INIBITÓRIA.

A exposição prenatal ao EtOH e/ou MeHg provoca um amplo espectro de sequelas no SNC, acarretando em diversos efeitos comportamentais e bioquímicos. Vários estudos relatam déficits cognitivos decorrentes da exposição prenatal ao EtOH e/ou MeHg em humanos (Streissguth *e cols.*, 1990; Mendola *e cols.*, 2002; Murata *e cols.*, 2004; Burden *e cols.*, 2005; Bailey e Sokol, 2008) e em animais (Dursun *e cols.*, 2006; Barbaccia *e cols.*, 2007; Carratù *e cols.*, 2008; Onishchenko *e cols.*, 2008; Maia *e cols.*, 2009a,b).

Reforçando os resultados obtidos no teste da esQUIVA INIBITÓRIA, o presente estudo também mostrou que as doses do EE da *C. paludosa*, administradas cronicamente, bem como a CAF usada como controle positivo, diminuiram

significativamente o tempo de investigação do rato jovem familiar no processo de esquecimento (exposição após 120 min da 1ª exposição ao rato adulto), sugerindo um efeito facilitador da MCD no teste de reconhecimento social.

Este efeito facilitador do EE também foi observado nos grupos de animais de MeHg e EtOH+MeHg. Entretanto, o EE não mostrou melhora da memória no grupo do EtOH. É importante notar que a facilitação da memória de reconhecimento social, induzida pela administração do EE, não pode ser unicamente explicada pela melhora da discriminação olfatória de ratos, uma vez que a administração do EE não alterou o tempo de investigação e exploração na primeira apresentação do rato juvenil, nos experimentos de reconhecimento social.

A exposição prenatal ao EtOH e/ou MeHg induz várias alterações neurocomportamentais e/ou bioquímicas em animais e humanos, proporcionando a um desequilíbrio da homeostase intracelular e levando as células ao estresse oxidativo (de Freitas *e cols.*, 2009; Deitrich *e cols.*, 2006; Maia *e cols.*, 2009a,b).

Os dados comportamentais, aqui apresentados, mostrando que a exposição ao EtOH e/ou MeHg, durante o SNC em desenvolvimento, induziu várias alterações comportamentais e déficits cognitivos, que podem ser provavelmente explicados por uma depleção nas enzimas antioxidantes, como a catalase e a Se-GPX, bem como um indução de peroxidação lipídica em tecidos cerebrais.

Lucena *e cols.* (2007b) demonstraram um potencial efeito protetor do EE da *C. paludosa* em condições neurológicas relacionadas à excitotoxicidade e estresse oxidativo. Este efeito pode ter sido por substâncias presentes no EE,

como alcalóides, flavonóides e/ou terpenos. Pesquisas recentes mostraram que alcalóides (Hung *e cols.*, 2008; Prediger *e cols.*, 2008; Vallejo *e cols.*, 2009), flavonóides (Yamakuni *e cols.*, 2008; Xu *e cols.*, 2009) e/ou terpenos (Kamatou *e cols.*, 2008; Pitisikas *e cols.*, 2007), presentes em extratos de plantas, são capazes de melhorar déficits cognitivos em roedores.

De acordo com nosso conhecimento, não há informações na literatura referentes aos efeitos centrais desta espécie, aqui investigada. Em conjunto, os dados sugerem que o EE da *C. paludosa* pode ter um importante efeito contra a ansiedade e depressão, além de melhorar as alterações cognitivas que podem estar associadas às doenças neurodegenerativas, cujas alterações podem estar correlacionadas ao estresse oxidativo.

IV. CONCLUSÕES FINAIS

Os resultados obtidos neste estudo demonstram que a exposição intra-uterina ao EtOH e/ou MeHg em ratos é capaz de interferir diretamente nas respostas comportamentais de proles adultas. O EE da *C. paludosa*, por sua vez, mostrou ter uma ação central em decorrência de seu provável efeito neuroprotetor e antioxidante, bloqueando os efeitos negativos relacionados à ansiedade, depressão e déficits de memória. Isto foi inferido a partir das seguintes observações:

1. Os dados presentes nesse estudo reforçam e complementam as pesquisas relacionadas à possível ação neuroprotetora da *C. paludosa*, ainda que os prováveis mecanismos desta neuroproteção não estejam ainda totalmente esclarecidos;
2. O tratamento crônico com o EE da *C. paludosa* reverteu os déficits comportamentais relacionados à ansiedade e depressão produzidos pela exposição ao EtOH e/ou MeHg em proles adultas de ratas, preservando os aspectos motores e locomotores normais em todos os animais, independente do tipo de tratamento;
3. O tratamento agudo com o EE de *C. paludosa*, ainda que não eficaz para impedir o comportamento sugestivo de ansiedade e depressão nos animais, apresentou uma excelente resposta mnemônica, favorecendo a MCD e MLD, tanto nos testes da esQUIVA inibitória do tipo “*step down*” (estímulo condicionado), quanto nos testes de reconhecimento social (estímulo não condicionado). O mesmo perfil de resposta foi observado quando do tratamento crônico;

4. Os efeitos protetores da *C. paludosa* foram acompanhados por acentuada indução de enzimas antioxidantes, em tecidos cerebrais envolvidos com processos cognitivos, e diminuição dos níveis de TBARS e hidroperóxidos lipídicos, sugerindo que sua administração poderia inibir, ao menos em parte, a formação das EROs e, conseqüentemente, atenuar danos cerebrais induzidos por estresse oxidativo;
5. A partir dos resultados presentes neste estudo, a *C. paludosa* pode ser considerada como uma promissora farmacoterapia natural, eficaz para aliviar ou impedir alguns dos efeitos deletérios produzidos pelos neurotóxicos EtOH e/ou MeHg, ainda que as interferências farmacocinéticas e farmacodinâmicas mereçam ser mais investigadas, assim como os aspectos químicos da planta.

***V. PERSPECTIVAS FUTURAS E
CONSIDERAÇÕES FINAIS***

O interesse em investigar a interação EtOH x MeHg está voltado para o aspecto da saúde na Amazônia. Os estudos realizados, até hoje, permitiram que as autoridades de saúde definissem um quadro clínico característico da doença de Minamata, quando os pacientes se encontram em estado avançado de comprometimento neurológico.

Existe, ainda, uma considerável incerteza sobre vários aspectos relacionados aos sintomas apresentados por esses pacientes nos primeiros estágios da doença, os melhores métodos de diagnóstico precoce, a correlação entre nível de mercúrio ingerido e o aparecimento dos diversos sintomas, e quais os mecanismos neuropatológicos pelos quais o MeHg afeta as células do organismo humano, inclusive os neurônios centrais.

Por outro lado, existe também a problemática envolvendo o alcoolismo onde o objetivo-chave é explicar porque as pessoas começam a beber, porque algumas bebem em excesso, e porque outras são incapazes de parar o consumo do álcool diante de consequências prejudiciais e/ou difíceis. Além disso, há interesse no entendimento dos fatores que influenciam o consumo dessa droga, que levam a transição do consumo médio a moderado para um consumo descontrolado.

Nossa visão geral dos aspectos relacionados ao alcoolismo também incluem muitas questões relacionadas aos mecanismos moleculares pelos quais o álcool influencia as proteínas celulares, o que determina a sensibilidade ou resistência ao álcool, e quais ações moleculares são responsáveis por consequências comportamentais específicas da ingestão do álcool e abuso a esta droga. Por meio de estudos multidisciplinares, muitas descobertas têm surgido

nas últimas décadas, que têm levado às mudanças na conceituação e tratamento do alcoolismo.

As pesquisas clínicas testando a eficácia dos medicamentos, por meio de uma triagem cuidadosamente controlada, aparecem como fatores importantes neste contexto. Acreditamos que nesta nova década, os maiores avanços serão dados nas descobertas de medicamentos, em especial daqueles advindos da natureza, tendo como fonte a própria Amazônia, a favor de um investimento para resolver a problemática aqui mostrada e, em especial, porque a Amazônia ainda é a maior riqueza natural que temos e que muito ainda tem para ser descoberta. Com isto é de se esperar que o grande custo sócio-econômico e problemas relacionados ao alcoolismo e/ou contaminantes ambientais, como o MeHg, possam ser revertidos.

***VI. REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS***

- ABE H, HIDAKA N, KAWAGOE C, ODAGIRI K, WATANABE Y, IKEDA T, ISHIZUKA Y, HASHIGUCHI H, TAKEDA R, NISHIMORI T, ISHIDA Y. Prenatal psychological stress causes higher emotionality, depression-like behavior, and elevated activity in the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *Neurosci Res* 59: 145-151, 2007.
- AEBI H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 105:121-126, 1984.
- AKAGI H, MALM O, KINJO Y, HARADA M, BRANCHES FJP, PFEIFFER WC, KATO H. Methyl mercury pollution in the Amazon, Brazil. *Sci Total Environment* 175: 85-95, 1995.
- AKAGI H, MALM O, BRANCHES FJP. Human exposure to mercury due to gold mining in the Amazon, Brazil – A review. *Environm Science* 5: 199-211, 1996.
- AKHONDZADEH S, FALLAH-POUR H, AFKHAM K, JAMSHIDI AA, KHALIGHI-CIGAROU DI F. Comparison of *Crocus sativus* L. and imipramine in the treatment of mild to moderate depression: a pilot double-blind randomized trial [ISRCTN45683816]. *BMC Complement Altern Med* 4: 12, 2004.
- AKHONDZADEH S, TAHMACEBI-POUR N, NOORBALA AA, AMINI H, FALLAH-POUR H, JAMSHIDI AH, KHANI M. *Crocus sativus* L. in the treatment of mild to moderate depression: a double-blind, randomized and placebo-controlled trial. *Phytother Res* 19: 148-151, 2005.
- AKHONDZADEH BASTI A, MOSHIRI E, NOORBALA AA, JAMSHIDI AH, ABBASI SH, AKHONDZADEH S. Comparison of petal of *Crocus sativus* L. and fluoxetine in the treatment of depressed out patients: a pilot double-blind randomized trial. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 31: 439-442, 2007.
- ALIEV G, OBRENOVICH ME, REDDY VP, SHENK JC, MOREIRA PI, NUNOMURA A, ZHU X, SMITH MA, PERRY G. Antioxidant therapy in Alzheimer's disease: theory and practice. *Mini Rev Med Chem* 8: 1395-1406, 2008.
- ALVES TMA, KLOOS H, ZANI CL. Eleutherinone, a novel fungitoxic naphthoquinone from *Eleuterine bulbosa* (Iridaceae). *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, 98: 709-712, 2003.
- AMIN-ZAKI L, MAJEED MA, ELHASSANI SB, CLARKSON TW, GREENWOOD MR, DOHERTY RA. Prenatal methylmercury poisoning. Clinical observations over five years. *Am J Dis Child* 133: 172-177, 1979.
- ARAUJO JA, LANDSBERG GM, MILGRAM NW, MIOLO A. Improvement of short-term memory performance in aged beagles by a nutraceutical supplement containing phosphatidylserine, *Ginkgo biloba*, vitamin E, and pyridoxine. *Can Vet J* 49: 379-385, 2008.
- ASCHNER M, SYVERSEN T, SOUZA DO, ROCHA JB, FARINA M. Involvement of glutamate and reactive oxygen species in methylmercury neurotoxicity. *Braz J Med Biol Res* 40: 285-291, 2007.
- AWASTHI YC, BEUTLER E, SRIVASTAVA SK. Purification and properties of human erythrocyte glutathione peroxide. *J Biol Chem* 250: 5144-5149, 1975.

- AUBLET F. Histoire des plantes de la Guiane Française. Didot, Paris, 1775.
- AZEVEDO FA. Toxicologia do mercúrio. São Paulo: RIMA 2003; 272 p.
- BAI H, HAI C, XI M, LIANG X, LIU R. Protective effect of maize silks (Maydis stigma) ethanol extract on radiation-induced oxidative stress in mice. *Plant Foods Hum Nutr* 2010. (In Press)
- BAILEY BA, SOKOL RJ. Pregnancy and alcohol use: Evidence and recommendations for prenatal care. *C Obstet Gynecol* 51: 436-444, 2008.
- BALICK JM, COX PA. Plants, people and culture: The science of ethnobotany. New York: Scientific American Library, a division of HPHLP, 1996.
- BALLATORI N, KRANCE SM, NOTENBOOM S, SHI S, TIEU K, HAMMOND CL. Glutathione dysregulation and the etiology and progression of human diseases. *Biol Chem*, 2009. [Epub ahead of print]
- BARBACCIA ML, SCACCIANOCE S, DEL BIANCO P, CAMPOLONGO P, TREZZA V, TATTOLI M, CUOMO V, STEARDO L. Cognitive impairment and increased brain neurosteroids in adult rats perinatally exposed to low millimolar blood alcohol concentrations. *Psychoneuroendocrinology* 32: 931-942, 2007.
- BARR HM, BOOKSTEIN FL, O'MALLEY KD, CONNOR PD, HUGGINS JE, STREISSGUTH AP. Binge drinking during pregnancy as a predictor of psychiatric disorders on the Structured Clinical Interview for DSMIV in young adult offspring. *Am J Psychiatry* 163:1061-1065, 2006.
- BAYER SA, ALTMAN J, RUSSO RJ, ZHANG X. Timetables of neurogenesis in the human brain based on experimentally determined patterns in the rat. *Neurotoxicology* 14: 83-144, 1993.
- BEAR MF, CONNORS BW, PARADISO MA. Neurociências: desvendando o sistema nervoso. 2 ed. Porto Alegre: Artmed, 2002, pp.775-807.
- BECKER HC, DIAZ-GRANADOS JL, RANDALL CL. Teratogenic actions of ethanol in the mouse: a minireview. *Pharmacol Bioch Behav* 55: 501-513, 1996.
- BEESON PB, MCDERMOTT W. In: Tratado de Medicina Interna (Cecil Loeb), 14^a Edição: Interamericana, 1977, pp. 78- 80.
- BEKALO TH, WOODMATAS SD, WOLDEMARIAM ZA. An ethnobotanical study of medicinal plants used by local people in the lowlands of Konta Special Woreda, southern nations, nationalities and peoples regional state, Ethiopia. *J Ethnobiol Ethnomed* 24: 5:26, 2009.
- BENNETT S, GRANT MM, ALDRED S. Oxidative stress in vacular dementia and Alzheimer's disease: a common Pathology. *J Alzheimers Diz* 2009. [Epub ahead of print]
- BERK M, NG F, DEAN O, DODD S, BUSH AI. Glutathione: a novel treatment target in psychiatry. *Trends Pharmacol Sci* 29: 346-351, 2008.

- BERNHEIM F, BERNHEIM MLC, WILBUR KM. The reaction between thiobarbituric and the oxidation products of certain lipids. *J Biol Chem* 174: 257-264, 1948.
- BERRETT JE. Animal behavior models in the analysis and understanding of anxiolytic drugs acting at serotonin receptors. In: Olivier B, Mos J, Slangen JL, editors. *Animal models in psychopharmacology*. Basel: Birkhäuser Verlag, 1991, pp. 37-52.
- BERTOSSI M, GIROLAMO F, ERREDE M, VIRGINTINO D, ELIA G, AMBROSI L, RONCALI L. Effects of methylmercury on the microvasculature of the developing brain. *Neurotoxicology* 25: 849-857, 2004.
- BHUTADA P, MUNDHADA Y, BANSOD K, BHUTADA C, TAWARI S, DIXIT P, MUNDHADA D. Ameliorative effect of quercetin on memory dysfunction in streptozotocin-induced diabetic rats. *Neurobiol Learn Mem*, 2010. [No Prelo]
- BLECHARZ-KLIN K, PIECHAL A, JONIEC I, PYRZANOWSKA J, WIDY-TYSZKIEWICZ E. Pharmacological and biochemical effects of *Ginkgo biloba* extract on learning, memory consolidation and motor activity in old rats. *Acta Neurobiol Exp* 69: 217-231, 2009.
- BOND NW, DI GIUSTO EL. Prenatal alcohol consumption and open-field behavior in rats: effects of age at time of testing. *Psychopharmacology* 58: 69-71, 1977.
- BONDY SC, MCKEE M. Disruption of the potential across the synaptosomal plasma membrane and mitochondria by neurotoxic agents. *Toxicol Lett* 58:13-21, 1991.
- BOSKABADY MH, ASLANI MR. Relaxant effect of *Crocus sativus* (saffron) on guinea-pig tracheal chains and its possible mechanisms. *J Pharm Pharmacol* 58: 1385-1390, 2006.
- BOURGUIGNON SC, CAVALCANTI DF, DE SOUZA AM, CASTRO HC, RODRIGUES CR, ALBUQUERQUE MG, SANTOS DO, DA SILVA GG, FERREIRA VF, DE PINO RT, ALVES CR. *Trypanosoma cruzi*: insights into naphthoquinone effects on growth and proteinase activity. *Exp Parasitol*, 2010 [No Prelo].
- BOYER CS, PETERSEN DR. Potentiation of cocaine-mediated hepatotoxicity by acute and chronic ethanol. *Alcoh Clin Exp Res* 14: 28-31, 1990.
- BRADFORD MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254, 1976.
- BRAGA R. Plantas do Nordeste, especialmente do Ceará. 4 ed. Ceará, 1960, p.30.
- BRITO FILHO D. Toxicologia Humana e Geral. 2ª Edição: Atheneu, 1988, pgs. 172-179.
- BROWN NJ. Mercury Pollution with Specific Reference to the Amazon Basin. M. Sc. Thesis. London: University of London, Imperial College of Science, Technology and Medicine, 1990.

- BURBACHER TM, RODIER PM, WEISS B. Methylmercury developmental neurotoxicity: A comparison of effects in humans and animals. *Neurotoxicol Teratol* 12: 191-202, 1990.
- BURD L, WILSON H. Fetal, infant, and child mortality in a context of alcohol use. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 127: 51-58, 2004.
- BURDEN MJ, JACOBSON SW, JACOBSON JL. Relation of prenatal alcohol exposure to cognitive processing speed and efficiency. *Alcohol Clin Exp Res* 29: 1473-1483, 2005.
- BURK RF, NISHIKI K, LAWRENCE RA, CHANCE B. Peroxide removal by selenium-dependent and selenium-independent glutathione peroxidases in hemoglobin-free perfused rat liver. *J Biol Chem* 253: 43-46, 1978.
- CAGIANO R, DE SALVIA MA, RENNA G, TORTELLA E, BRAGHIROLI D, PARENTI C, ZANOLI P, BARALDI M, ANNAU Z, CUOMO V. Evidence that exposure to methyl mercury during gestation induces behavioral and neurochemical changes in offspring of rats. *Neurotoxicol Teratol* 12: 23-28, 1990.
- CAHILL L, BRIONI J, IZQUIERDO I. Retrograde memory enhancement by diazepam: its relation to anterograde amnesia and some clinical implications. *Psychopharmacology* 90: 554-556, 1986.
- CAHILL A, STABLEY GJ, WANG X, HOEK JB. Chronic ethanol consumption causes alterations in the structural integrity of mitochondrial DNA in aged rats. *Hepatology* 30: 881-888, 1999.
- CAMMAROTA M, BARROS DM, VIANNA MRM, BEVILAQUA LRM, COITINHO A, SZAPIRO G, IZQUIERDO LA, MEDINA JH, IZQUIERDO I. The transition from memory retrieval to extinction. *Acad Bras Ciênc* 76: 573-582, 2004.
- CAMMAROTA M, BEVILAQUA LR, ROSSATO JI, LIMA RH, MEDINA JH, IZQUIERDO I. Parallel memory processing by the CA1 region of the dorsal hippocampus and the basolateral amygdala. *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 10279-1084, 2008.
- CAMPOS MM, FERNANDES ES, FERREIRA J, SANTOS AR, CALIXTO JB. Antidepressant-like effects of *Trichilia catigua* (Catuaba) extract: evidence for dopaminergic-mediated mechanisms. *Psychopharmacology* 182: 45-53, 2005.
- CARRATÙ MR, BORRACCI P, COLUCCIA A, GIUSTINO A, RENNA G, TOMASINI MC, RAISI E, ANTONELLI T, CUOMO V, MAZZONI E, FERRARO L. Acute exposure to methylmercury at two developmental windows: focus on neurobehavioral and neurochemical effects in rat offspring. *Neuroscience* 141: 1619-1629, 2006.
- CARRATÙ MR, COLUCCIA A, MODAFERI AME, BORRACCI P, SCACCIANOCE S, SAKAMOTO M, CUOMO V. Prenatal Methylmercury Exposure: Effects on stress response during active learning. *Bull Environ Contam Toxicol* 81: 539-542, 2008.
- CASTOLDI AF, COCCINI T, CECCATELLI S, MANZO L. Neurotoxicity and molecular effects of methylmercury. *Brain Res Bull* 55: 197-203, 2001.

- CELIS M, GOLDBLATT P, BETANCUR J. Sinopsis del género *Cipura* (Iridaceae). In: Libro de resúmenes del VII Congreso Latinoamericano de Botánica y II Colombiano. Cartagena de Indias – Colombia. 2002, p. 406.
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Alcohol consumption among women who are pregnant or who might become pregnant—United States, 2002. *MMWR Morb Mort Wkly Rep* 53: 1178-1181, 2004.
- CHOI BH, LAPHAM LW, AMIN-ZAKI L, SALEEM T. Abnormal neuronal migration, deranged cerebral cortical organization, and diffuse white matter astrocytosis of human fetal brain: a major effect of methylmercury poisoning in utero. *J Neuropathol Exp Neurol* 37: 719-733, 1978.
- CHOI BH. The effects of methylmercury on the developing brain. *Prog Neurobiol* 32: 447-470, 1989.
- CHOI BH, YEE S, ROBLES M. The effects of glutathione S-transferase in methylmercury poisoning. *Toxicol Appl Pharmacol* 141: 357-364, 1996.
- CHONPATHOMPIKUNLERT P, WATTANATHORN J, MUCHIMAPURA S. Piperine, the main alkaloid of Thai black pepper, protects against neurodegeneration and cognitive impairment in animal model of cognitive deficit like condition of Alzheimer's disease. *Food Chem Toxicol* 48: 798-802, 2010.
- COLES CD, KABLE JA, TADDEO E. Math Performance and Behavior Problems in Children Affected by Prenatal Alcohol Exposure: Intervention and Follow-Up. *J Dev Behav Pediatr* 30: 7-15, 2009.
- CORRÊA MP. Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, 1994, vol 1, p. 78.
- COSTA LC, ASCHNER M, VITALONE A, SYVERSEN T, SOLDIN OP. Developmental neuropathology of environmental agents. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 44: 87-110, 2004.
- COSTA V, MORADAS-FERREIRA P. Oxidative stress and signal transduction in *Saccharomyces cerevisiae*: insights into ageing, apoptosis and diseases. *Mol Asp Med* 22: 217-246, 2001.
- COUNTER SA, BUCHANAN LH. Mercury exposure in Children: a review. *Toxicol. Applied Pharmacol* 198: 209-230, 2004.
- CRUZ AP, FREI F, GRAEFF FG. Ethnopharmacological analysis of rat behavior on the elevated plus-maze. *Pharmacol Biochem Behav* 49: 171-176, 1994.
- CRYAN JF, LUCKI I. Antidepressant-like behavioral effects mediated by 5-Hydroxytryptamine_{2c} receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 295: 1120-1126, 2000.
- CRYAN JF, MARKOU A, LUCKI I. Assessing antidepressant activity in rodents: recent developments and future need. *Trends Pharmacol Sci* 23: 238-245, 2002.

- CUNHA RA. Adenosine as a neuromodulator and as a homeostatic regulator in the nervous system: different role, different sources and different receptors. *Neurochem Int* 38: 107-125, 2001.
- DA SILVA GE, RAMOS A, TAKAHASHI RN. Comparison of voluntary ethanol intake by two pairs of rat lines used as genetic models of anxiety. *Braz J Med Biol Res* 37: 1511-1517, 2004.
- DAVIDSON PW, MYERS GJ, WEISS B. Mercury exposure and child development outcomes. *Pediatrics* 113: 1023-1029, 2004.
- DANTZER R, BLUTHÉ RM, KOOB GF, LE MOAL M. Modulation of social memory in male rats by neurohypophyseal peptides. *Psychopharmacology* 91: 363-368, 1987.
- DE ARAÚJO FY, SILVA MI, MOURA BA, DE OLIVEIRA GV, LEAL LK, VASCONCELOS SM, VIANA GS, DE MORAES MO, DE SOUSA FC, MACÊDO DS. Central nervous system effects of the essential oil of the leaves of *Alpinia zerumbet* in mice. *J Pharm Pharmacol* 61:1521-1527, 2009.
- DEBES F, BUDTZ-JØRGENSEN E, WEIHE P, WHITE RF, GRANDJEAN P. Impact of prenatal methylmercury exposure on neurobehavioral function at age 14 years. *Neurotoxicol Teratol* 28: 363-375, 2006.
- DE FREITAS AS, FUNCK VR, ROTA MDOS S, BOHRER D, MÖRSCHBÄCHER V, PUNTEL RL, NOGUEIRA CW, FARINA M, ASCHNER M, ROCHA JB. Diphenyl diselenide, a simple organoselenium compound, decreases methylmercury-induced cerebral, hepatic and renal oxidative stress and mercury deposition in adult mice. *Brain Res Bull* 79: 77-84, 2009.
- DEKOSKY ST, FURBERG CD. Turning over a new leaf: *Ginkgo biloba* in prevention of dementia? *Neurology* 70: 1730-1731, 2008.
- DELGADO MR, OLSSON A, PHELPS EA. Extending animal models of fear conditioning to humans. *Biol Psychol* 73: 39-48, 2006.
- DEITRICH R, ZIMATKIN S, PRONKO S. Oxidation of ethanol in the brain and its consequences. *Alcohol Res Health* 29: 266-273, 2006.
- DE MENDONÇA A, RIBEIRO JA. Endogenous adenosine modulates long-term potentiation in the hippocampus. *Neuroscience* 62: 385-390, 1994.
- DE MENDONÇA A, ALMEIDA T, BASHIR ZI. Endogenous adenosine attenuates long-term depression and depotentiation in the CA1 region of the rat hippocampus. *Neuropharmacology* 36: 161-167, 1997.
- DETKE MJ, RICKELS M, LUCKI I. Active behaviors in the rat forced swimming test differentially produced by serotonergic and noradrenergic antidepressants. *Psychopharmacology* 121: 66-72, 1995.

- DiCICCO-BLOOM E, SONDELL M. Neural development and neurogenesis. Kaplan & Sadock's Comprehensive Textbook of Psychiatry, Vol. 8. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, pp. 33-49, 2005
- DO NASCIMENTO JL, OLIVEIRA KR, CRESPO-LOPEZ ME, MACCHI BM, MAUÉS LA, PINHEIRO MDA C, SILVEIRA LC, HERCULANO AM. Methylmercury neurotoxicity & antioxidant defenses. *Indian J Med Res* 128: 373-382, 2008.
- DURSun I, JAKUBOCUSKA-DOGru E, UZBAY T. Effects of prenatal exposure to alcohol on activity, anxiety, motor coordination, and memory in young adult Wistar rats. *Pharmacol Biochem Behav* 85: 345-355, 2006.
- DUTczak WJ, CLARKSON TW, BALLATORI N. Biliary-hepatic recycling of a xenobiotic gallbladder absorption of methylmercury. *Am Journ Physiol* 260: G873-G880, 1991.
- EMPTAGE NJ, CAREW TJ. Long-term synaptic facilitation in the absence of short-term facilitation in *Aplysia* neurons. *Science* 262: 253-256, 1993.
- ERCAL N, GURER-ORHAN H, AYKIN-BURNS N. Toxic metals and oxidative stress part I: mechanisms involved in metal-induced oxidative damage. *Curr Top Med Chem* 1: 529-539, 2001.
- ESTERBAUER H, CHEESEMAN KH. Determination of aldehydic lipid peroxidation products malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods Enzymol* 186: 407-421, 1990.
- FARINA M, FRANCO JL, RIBAS CM, MEOTTI FC, MISSAU FC, PIZZOLATTI MG, DAFRE AL, SANTOS AR. Protective effects of *Polygala paniculata* extract against methylmercury-induced neurotoxicity in mice. *J Pharm Pharmacol* 57: 1503-1508, 2005.
- FERRARO L, TOMASINI MC, TANGANELLI S, MAZZA R, COLUCCIA A, CARRATÙ MR, GAETANI S, CUOMO V, ANTONELLI T. Developmental exposure to methylmercury elicits early cell death in the cerebral cortex and long-term memory deficits in the rat. *Int J Dev Neurosci* 27: 165-174, 2009.
- FILE SE. Behavioral detection of anxiolytic action. In: J.M. Elliott, D.J. Heal and C.A. Marsden, Editors, Experimental approaches to anxiety and depression, John Wiley & Sons Ltd., New York, 1992, pp. 25-44.
- FLOHÉ L, GÜNZLER WA, SCHOCK HH. Glutathione peroxidase-selenoenzyme. *Febs Lett* 32: 132-134, 1973.
- FLOHÉ L, GÜNZLER WA. Assay of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol* 105: 114-121, 1984.
- FOGLIO MA, QUEIROGA CL, SOUSA IM DE O, RODRIGUES RAF. Plantas medicinais como fonte de recursos terapêuticos: Um modelo multidisciplinar. *MultiCiência* 7: 1-8, 2006.

- FONFRÍA E, RODRÍGUEZ-FARRÉ E, SUÑD C. Mercury interaction with the GABA (A) receptor modulates the benzodiazepine binding site in primary cultures of mouse cerebellar granule cells. *Neuropharmacology* 41: 819-833, 2001.
- FONG W, CHOY K. Purification and characterization of grass carp mitochondrial aldehyde dehydrogenase. *Chem Biol Interact* 130-132: 161-171, 2001.
- FRANCO JL, BRAGA HDE C, NUNES AK, RIBAS CM, STRINGARI J, SILVA AP, GARCIA POMBLUM SC, MORO AM, BOHRER D, SANTOS AR, DAFRE AL, FARINA M. Lactational exposure to inorganic mercury: evidence of neurotoxic effects. *Neurotoxicol Teratol* 29: 360-367, 2007.
- FREDHOLM BB, IJZERNAN AP, JACOBSON KA, KLOTZ KN, LINDEN J. International Union of Pharmacology XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors, *Pharmacol Rev* 53: 527-552, 2001.
- FURUYA H, AIKAWA H, YOSHIDA T, OKAZAKI I. Effects of ethyl alcohol administration to THA rat dams during their gestation period on learning behavior and on levels of monoamines and metabolites in the brain of pups after birth. *Alcohol Clin Exp Res* 20: 305A-310A, 1996.
- GATTI R, BELLETI S, UGGERI J, VETTORI MV, MUTTI A, SCANDROGLIO R, ORLANDINI G. Methylmercury cytotoxicity in PC12 cells is mediated by primary glutathione depletion independent of excess reactive oxygen species generation. *Toxicology* 204: 175-185, 2004.
- GAUTHIER TW, PING XD, HARRIS FL, WONG M, ELBAHESH H, BROWN LA. Fetal alcohol exposure impairs alveolar macrophage function via decreased glutathione availability. *Ped Res* 57: 76-81, 2005.
- GILBERT SG, GRANT-WEBSTER KS. Neurobehavioral effects of developmental methylmercury exposure. *Environ Health Perspect* 103: 135-142, 1995.
- GOLDBLATT P, HENRICH JE. Notes on *Cipura* (Iridaceae) in south and central America, and a new species from Venezuela. *An Missouri Bot Gard* 74:333-340, 1987.
- GOLDBLATT P. Iridaceae [with contributions from J. C. Manning & P. Rudall]. In: K. Kubitzki (editor), *Families and Genera of Flowering Plants*, vol 2. Springer Verlag, Heidelberg, pp. 295-335, 1998.
- GOLDBLATT P. Phylogeny and classification of Iridaceae. *An Missouri Bot Gard* 77: 607-627, 1990.
- GRALEWICZ S, WIADERNA D, LUTZ P, SITAREK K. Neurobehavioural functions in adult progeny of rat mothers exposed to methylmercury or 2,2', 4,4', 5,5'-hexachlorobiphenyl (PCB 153) alone or their combination during gestation and lactation. *Int J Occup Med Environ Health* 22: 277-291, 2009.
- GRANDJEAN P, WEIHE P. Neurobehavioral effects of intrauterine mercury exposure: potential sources of bias. *Environ Res* 61:176-183, 1993.

- GRANDJEAN P, WEIHE P, WHITE RF, DEBES F, ARAKI S, YOKOYAMA K, MURATA K, SØRENSEN N, DAHL R, JØRGENSEN PL. Cognitive deficit in 7-year-old children with prenatal exposure to methylmercury. *Neurotoxicol Teratol* 19: 417-428, 1997.
- GROTTO D, DE CASTRO MM, BARCELOS GR, GARCIA SC, BARBOSA F JR. Low level and sub-chronic exposure to methylmercury induces hypertension in rats: nitric oxide depletion and oxidative damage as possible mechanisms. *Arch Toxicol* 83: 653-662, 2009.
- GRUM DK, KOBAL AB, ARNERIC N, HORVAT M, ZENKO B, DZEROSKI S, OSREDKAR J. Personality traits in miners with past occupational elemental mercury exposure. *Environ Health Perspect* 114: 290-296, 2006.
- GUERRI C, BAZINET A, RILEY EP. Foetal Alcohol Spectrum Disorders and Alterations in Brain and Behavior. *Alcohol Alcohol* 2009. [Epub ahead of print]
- GUNTER KK, GUNTER TE. Transport of calcium by mitochondria. *J Bioenerg Biomembr* 26: 471-485, 1994.
- HALLIWELL B. Reactive oxygen species and the central nervous system. *J Neurochem* 59: 1609-1623, 1992.
- HALLIWELL B, GUTTERIDGE JMC. Free Radicals in Biology and Medicine. Oxford University Press, 3 ed., 1999.
- HALLIWELL B. Oxidative stress and neurodegeneration. Where are we now? *J Neurochem* 97:1634-1658, 2006.
- HANDLEY SL, MITHANI S. Effects of alpha-adrenoreceptor agonists in a maze-exploration model of "fear"-motivated behaviour. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 327: 1-5, 1984.
- HARA H, MARUYAMA N, YAMASHITA S, HAYASHI Y, LEE KH, BASTOW KF, CHAIRUL RM, IMAKURA Y. Elecanacin, a novel new naphthoquinone from the bulb of *Eleutherine americana*. *Chem Pharm Bull* 45: 1714-1716, 1997.
- HARADA M. Minamata disease: Methylmercury poisoning in Japan caused by environmental pollution. *Crit Rev Toxicol* 25: 1-24, 1995.
- HARE MF, ATCHISON WD. Comparative actions of methylmercury and divalent inorganic mercury on nerve terminal and intraterminal mitochondrial membrane potentials. *JPET* 261: 166-172, 1992.
- HERMAN LE, ACOSTA MC, CHANG PN. Gender and attention deficits in children diagnosed with a Fetal Alcohol Spectrum Disorder. *Can J Clin Pharmacol* 15: 411-419, 2008.
- HERMES-LIMA M, STOREY KB. Antioxidant defenses and metabolic depression in a pulmonate land snail. *Am J Physiol* 268: R1386- 1393, 1995.

- HERMES-LIMA M, WILLMORE WG, STOREY KB. Quantification of lipid peroxidation in tissue extracts based of Fe(III)xylene orange complex formation. *Free Radic Biol Med* 1995;19:271-280.
- HO YS, SO KF, CHANG RC. Anti-aging herbal medicine-How and why can they be used in aging-associated neurodegenerative diseases? *Ageing Res Rev* 13: 2009. [No prelo]
- HOLICK KA, LEE DC, HEN R, DULAWA SC. Behavioral effects of chronic fluoxetine in BALB/cJ mice do not require adult hippocampal neurogenesis or the serotonin 1A receptor. *Neuropsychopharmacology* 33: 406-417, 2008.
- HONG JH, YU ES, HAN AR, NAM JW, SEO EK, HWANG ES. Isoeleutherin and eleutherinol, naturally occurring selective modulators of Th cell-mediated immune responses. *Biochem Biophys Res Commun* 371: 278-282, 2008.
- HOSSEINZADEH H, NORAEI NB. Anxiolytic and hypnotic effect of *Crocus sativus* aqueous extract and its constituents, crocin and safranal, in mice. *Phytother Res* 23: 768-774, 2009.
- HOSTETTMANN K, QUEIROZ EF, VIEIRA PC. A importância das plantas medicinais: Princípios ativos de plantas superiores. Série de textos da Escola de Verão em Química-IV, São Carlos, SP, EdUFSCar, 2003, 152 p.
- HOVATTA I, TENNANT RS, HELTON R, MARR RA, SINGER O, REDWINE JM, ELLISON JA, SCHADT EE, VERMA IM, LOCKHART DJ, BARLOW C. Glyoxalase 1 and glutathione reductase 1 regulate anxiety in mice. *Nature* 438: 662-666, 2005.
- HUANG L, COX C, MYERS GJ, DAVIDSON PW, CERNICHIARI E, SHAMLAYE CF, SLOANE-REEVES J, CLARKSON TW. Exploring nonlinear association between prenatal methylmercury exposure from fish consumption and child development: evaluation of the Seychelles Child Development Study nine-year data using semi parametric additive models. *Environ Res* 97: 100-108, 2005.
- HUNTER D, RUSSELL DS. Focal cerebral and cerebellar atrophy in a human subject due to organic mercury compounds. *Neurol Neurosurg Psych* 17: 235-241, 1954.
- IFESAN BO, JOYCHARAT N, VORAVUTHIKUNCHAI SP. The mode of antistaphylococcal action of *Eleutherine americana*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 57: 193-201, 2009.
- ITOIGAWA M, ITO C, TAN HT, OKUDA M, TOKUDA H, NISHINO H, FURUKAWA H. Cancer chemopreventive activity of naphthoquinones and their analogs from *Avicennia* plants. *Cancer Lett* 174: 135-139, 2001.
- IZQUIERDO I, BARROS DM, MELLO E SOUZA T, DE SOUZA MM, IZQUIERDO LA, MEDINA JH. Mechanisms for memory types differ. *Nature* 393: 635-636, 1998.
- IZQUIERDO I, MEDINA JH, VIANNA MR, IZQUIERDO LA, BARROS DM. Separate mechanisms for short- and long-term memory. *Behav Brain Res* 103: 1-11, 1999.

- IZQUIERDO I. Memória. Editora Artmed, Porto Alegre, 2002.
- JIM SX, FEIG LA. Long-Term Potentiation in the CA1 Hippocampus Induced by NR2A Subunit-Containing NMDA Glutamate Receptors Is Mediated by Ras-GRF2/Erk Map Kinase Signaling. *PLoS One* 5: 11732, 2010.
- JIRIKOWIC T, KARTIN D, OLSON HC. Children with fetal alcohol spectrum disorders: a descriptive profile of adaptive function. *Can J Occup Ther* 75: 238-248, 2008.
- JORDÃO JÚNIOR AA, CHIARELLO PG, BERNARDES MSM, VANNUCCHI H. Peroxidação lipídica e etanol: papel da glutatona reduzida e da vitamina E. *Medicina* 31: 434-449, 1998.
- JUNG HA, MIN BS, YOKOZAWA T, LEE JH, KIM YS, CHOI JS. Anti-Alzheimer and antioxidant activities of Coptidis Rhizoma alkaloids. *Biol Pharm Bull* 32: 1433-1438, 2009.
- KANDEL ER, SCWARTZ JH, JESSE TM. Principles of neural science. 4 ed. New York: Elsevier, 2000.
- KANOWSKI S, HOERR R. Proof of the efficacy of the *Ginkgo biloba* special extract egb76 1 in outpatients suffering from mild to moderate primary degenerative dementia of the Alzheimer type of multi-infarct dementia. *Phytomedicine* 4: 215-222, 1997.
- KASCHEL R. Ginkgo biloba: specificity of neuropsychological improvement--a selective review in search of differential effects. *Hum Psychopharmacol* 24:345-3470, 2009.
- KESSLER RC, MCGONAGLE KA, ZHAO S, NELSON CB, HUGHES M, ESHLEMAN S, WITTCHEM HU, KENDLER KS. Lifetime and 12-month prevalence of DSM-III-R psychiatric disorders in the United States: results from the National Comorbidity Survey. *Arch Gen Psychiatry* 51: 8-19, 1994.
- KESSLER RC, BERGLUND P, DEMLER O, JIN R, MERIKANGAS KR, WALTERS EE. Lifetime prevalence and age-of-onset distributions of DSM-IV disorders in the National Comorbidity Survey Replication. *Arch Gen Psychiatry* 62: 593-602, 2005.
- KIRBY LG, LUCKI I. The effect of repeated exposure to forced swimming on extracellular levels of 5-hydroxytryptamine in the rat. *Stress* 2: 251-263, 1998.
- KNOPIK VS, JACOB T, HABER JR, SWENSON LP, HOWELL DN. Paternal alcoholism and offspring ADHD problems: a children of twins design. *Twin Res Hum Genet* 12: 53-62, 2009.
- KONGKATHIP N, PRADIDPHOL N, HASITAPAN K, KONGKATHIP B. Synthesis and anticancer evaluation of naphthoquinone esters with 2'-cyclopentyl and 2'-cyclohexyl substituents. *Biosci Biotechnol Biochem* 74: 1205-1214, 2010.
- KULKARNI SK, DHIR A. Berberine: a plant alkaloid with therapeutic potential for central nervous system disorders. *Phytother Res* 24: 317-324, 2010.

- KUSUMA IW, ARUNG ET, ROSAMAH E, PURWATININGSIH S, KUSPRADINI H, SYAFRIZAL, ASTUTI J, KIM Y-U, SHIMIZU K. Antidermatophyte and antimelanogenesis compound from *Eleutherine americana* grown in Indonesia. *J Nat Med* 64: 223-226, 2010.
- LACERDA LD, PFEIFFER WC, SILVEIRA EG, BASTOS WR, SOUZA CMM. Contaminação por mercúrio na Amazônia: análise preliminar do rio Madeira, RO. I Congr. Brasil Geoquímica, Porto Alegre, Sociedade Brasileira de Geoquímica, Rio de Janeiro, Anais, p.295-299, 1987.
- LACKOWICZ JR, ANDERSON CJ. Permeability of lipid bilayers to methylmercuric chloride: quantification by fluorescence quenching of a carbazole labeled phospholipid. *Chem Biol Interaction* 30: 309-323, 1980.
- LAFON-CAZAL M, PIETRI S, CULCASI M, BOCKAERT J. NMDA-dependent superoxide production and neurotoxicity. *Nature* 364: 535-537, 1993.
- LANDRIGAN PJ, SONAWANE B, BUTLER RN, TRASANDE L, CALLAN R, DROLLER D. Early environmental origins of neurodegenerative disease in later life. *Environ Health Perspect* 113: 1230-1233, 2005.
- LAPANNA D, CUCCURULLO F. TBA test and 'free' MDA assay in evaluation of lipid peroxidation and oxidative stress in tissue systems. *Am J Physiol* 265: H1030-H1031, 1993.
- LECHTENBERG M, SCHEPMANN D, NIEHUES M, HELLENBRAND N, WÜNSCH B, HENSEL A. Quality and functionality of saffron: quality control, species assortment and affinity of extract and isolated saffron compounds to NMDA and sigma1 (sigma-1) receptors. *Planta Med* 74: 764-772, 2008.
- LEUTWYLER J, DAEPEN JB, GERBER S, HOHLFELD P. Pregnancy and alcohol consumption. *Rev Med Suisse Romande* 124: 47-50, 2004.
- LIEBER CS. Ethanol. metabolism, cirrhosis and alcoholism. *Clin Chim Acta* 257: 59-84, 1997.
- LIMKE TL, OTERO-MONTANEZ JKL, ATCHISON WD. Evidence for interactions between intracellular calcium stores during methylmercury-induced intracellular calcium dysregulation in rat cerebellar granule neurons. *JPET* 304: 949-958, 2003.
- LIMURO Y, BRADFORD BU, GAO W, KADIKA M, MASON RP, STEFANOVIC B, BRENNER DA, THURMAN RG. Detection of alpha-hydroxyethyl free radical adducts in the pancreas after chronic exposure to alcohol in the rat. *Mol Pharmacol* 50: 656-661, 1996.
- LIU Y, SCHUBERT DR. The specificity of neuroprotection by antioxidants. *J Biomed Sci* 16:98, 2009
- LOPACHIN RM, ASCHNER M. Glial-neuronal interactions: the relevance to neurotoxic mechanisms. *Toxicol Appl Pharmacol* 118: 141-158, 1993.

- LOPEZ-REVUELTA A, SANCHES-GALLEGO JI, HERNANDEZ-HERNANDEZ A, SANCHEZ-YAGUE J, LLANILLO M. Membrane cholesterol contents influence the protective effects of quercetin and rutin in erythrocytes damaged by oxidative stress. *Chem Biol Interact* 161: 79-91, 2006.
- LUCENA GM, GADOTTI VM, MAFFI LC, SILVA GS, AZEVEDO MS, SANTOS AR. Antinociceptive and anti-inflammatory properties from the bulbs of *Cipura paludosa* Aubl. *J Ethnopharmacol* 112:19-25, 2007a.
- LUCENA GM, FRANCO JL, RIBAS CM, AZEVEDO MS, MEOTTI FC, GADOTTI VM, DAFRE AL, SANTOS ARS, FARINA M. *Cipura paludosa* extract prevent methyl mercury-induced neurotoxicity in mice. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 101:127-131, 2007b.
- LUCENA GM, PORTO FA, CAMPOS EG, AZEVEDO MS, CECHINEL-FILHO V, PREDIGER RDS, FERREIRA VM. *Cipura paludosa* attenuates long-term behavioral deficits in rats exposed to methylmercury during early development. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2010a [No Prelo].
- LUCENA GM, MAIA CS, GONÇALVES A DE S, MARTINS VMF, FERREIRA VM. Interação álcool e metilmercúrio: um fator de risco na gravidez. *Ver Brasília Med*, 2010b [No Prelo].
- MAHABUSARAKAM W, HEMTASIN C, CHAKTHONG S, VORAVUTHIKUNCHAI SP, OLAWUMI IB. Naphthoquinones, anthraquinones and naphthalene derivatives from the bulbs of *Eleutherine americana*. *Planta Med* 76: 345 – 349, 2010.
- MAIA CS. Efeitos do etanol e/ou metilmercúrio no desenvolvimento do Sistema Nervoso Central: Alterações morfológicas e comportamentais em ratos adultos. Brasília, 2009. Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.
- MAIA CS, LUCENA GM, CORRÊA PBF, SERRA RB, MATOS RWM, MENEZES FC, SANTOS SN, SOUSA JB, COSTA ET, FERREIRA VM. Interference of ethanol and methylmercury in the developing central nervous system. *Neurotoxicology* 30: 23-30, 2009a.
- MAIA CD, FERREIRA VM, KAHWAGE RL, DO AMARAL MN, SERRA RB, NORO DOS SANTOS S, DO NASCIMENTO JL, RODRIGUES LG, TRÉVIA N, DINIZ CW. Adult brain nitrenergic activity after concomitant prenatal exposure to ethanol and methyl mercury. *Acta Histochem*, 2009b. [In press]
- MAIA CD, FERREIRA VM, DINIZ JS, CARNEIRO FP, DE SOUSA JB, DA COSTA ET, TOMAZ C. Inhibitory avoidance acquisition in adult rats exposed to a combination of ethanol and methylmercury during central nervous system development. *Behav Brain Res* 211: 191-197, 2010.
- MAIER SE, WEST JR. Regional differences in cell loss associated with binge-like alcohol exposure during the first two trimesters equivalent in the rat. *Alcohol* 23: 49-57, 2001.

- MANSOURI A, SABINE AMSELLEM CD, PESSAYRE D, FROMENTY B. Acute ethanol administration oxidatively damages and depletes mitochondrial DNA in mouse liver, brain, heart, and skeletal muscles: protective effects of antioxidants. *JPET* 298: 737-743, 2001.
- MARTIN C, DUCLOS M, MORMEDE P, MANIER G, CHAOULOFF F. Hippocampal and striatal [(3)H]5-HT reuptake under acute stressors in two rat strains differing for their emotivity. *Neurosci Lett* 288: 246-248, 2000.
- MARTY MS, ATCHISON WD. Pathways mediating Ca²⁺ entry in rat cerebellar Ganule cells following *in vitro* exposure to methyl mercury. *Toxicol Appl Pharmacol* 7: 319-330, 1997.
- MAY M. Disturbing behavior: neurotoxic effects in children. *Environ Health Perspect* 108: A262-267, 2000.
- MCBRIDE WJ, LI TK. Animal models of alcoholism: neurobiology of high alcohol-drinking behavior in rodents. *Critic Rev Neurobiol* 12: 339-369, 1998.
- MENDOLA P, SELEVAN SG, GUTTER S, RICE D. Environmental factors associated with a spectrum of neurodevelopmental deficits. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev* 8:188-197, 2002.
- MIKKANEM HM, GANTHER HE. Effect of mercury on erythrocyte glutathione reductase activity, *in vivo* and *in vitro* studies. *Bull Environ Contam Toxicol* 12: 10-16, 1974.
- MILIOLI EM, COLOGNI P, SANTOS CC, MARCOS TD, YUNES VM, FERNANDES MS, SCHOENFELDER T, COSTA-CAMPOS L. Effect of acute administration of hidroalcoholic extract of *Illex paraguariensis* St Hilaire (Aquafoliaceae) in animal models of Parkinson`s disease. *Phytother Res* 21: 771-776, 2007.
- MIURA K, CLARKSON TW. Reduced methylmercury accumulation in a methylmercury-resistant rat pheochromocytoma PC12 cell line. *Toxicol Appl Pharmacol* 118: 39-45, 1993.
- MONSEN RB. Prevention is best for fetal alcohol syndrome. *J Pediatr Nurs* 24: 60-61, 2009.
- MONTGOMERY KC. The relation between fear induced by novel stimulation and exploratory behaviour. *J Comp Physiol Psychol* 48: 254-260, 1955.
- MONTOLIU C, SANCHO-TELLO M, AZORIN I, BURGAL M, VALLES S, RENAU-PIQUERAS J, GUERRI C. Ethanol increases cytochrome P4502E1 and induces oxidative stress in astrocytes. *J Neurochem* 65: 2561-2570, 1995.
- MOSHIRI E, BASTI AA, NOORBALA AA, JAMSHIDI AA, HESAMEDDIN ABBASI S, AKHONDZADEH S. *Crocus sativus* L. (petal) in the treatment of mild-to-moderate depression: a double blind, randomized and placebo-controlled trial. *Phytomedicine* 13: 607-611, 2006.

- MURATA K, SAKAMOTO M, NAKAI K, WEIHE P, DAKEISHI M, IWATA T, LIU XJ, OHNO T, KUROSAWA T, KAMIYA K, SATOH H. Effects of methylmercury on neurodevelopment in Japanese children in relation to the Madeiran study. *Int Arch Occup Environ Health* 77: 571-579, 2004.
- NAKATOMI Y, YOKOYAMA C, KINOSHITA S, MASAKI D, TSUCHIDA H, ONOE H, YOSHIMOTO K, FUKUIS K. Serotonergic mediation of the antidepressant-like effect of the green leaves odor in mice. *Neurosci Lett* 436: 167-170, 2008.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL. Toxicological effects of methylmercury. Washington, DC: National Academy Press, 2000.
- NAYAK RB, MURTHY P. Fetal Alcohol Spectrum Disorder. *Indian Pediatr* 45: 977-983, 2008.
- NEESE S, La GRANGE L, TRUJILLO E, ROMERO D. The effects of ethanol and silymarin treatment during gestation on spatial working memory. *BMC Complement Altern Med* 4: 4, 2004.
- NG F, BERK M, DEAN O, BUSH AI. Oxidative stress in psychiatric disorders: evidence base and therapeutic implications. *Int J Neuropsychopharmacol* 11: 851-876, 2008.
- NODARI RO, GUERRA MP. Biodiversidade: Aspectos Biológicos, geográficos, legais e éticos, Apud: O. M. C. Simões, R. P. Schenkel, G. Gosmann, P. C. J. Mello, A. L. Mentz, P. R. Petrovick, Farmacognosia da planta medicamento. Editora da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1999.
- NOORBALA AA, AKHONDZADEH S, TAHMACEBI-POUR N, JAMSHIDI AH. Hydro-alcoholic extract of *Crocus sativus* L. versus fluoxetine in the treatment of mild to moderate depression: a double-blind, randomized pilot trial. *J Ethnopharmacol* 97: 281-284, 2005.
- NORSETH T, CLARKSON TW. Studies on the biotransformation of ²⁰³Hg-labeled methylmercury chloride in rats. *Arch Environm Health* 21: 717-727, 1970.
- O'CONNOR MJ, SHAH B, WHALEY S, CRONIN P, GUNDERSON B, GRAHAM J. Psychiatric illness in a clinical sample of children with prenatal alcohol exposure. *Am J Drug Alcohol Abuse* 28: 743-754, 2002.
- OHMIYA Y, NAKAI K. Effect of methylmercury on the ethanol elimination from the blood and the activity of alcohol dehydrogenase. *Jpn J Pharmacol* 27: 545-551, 1977.
- ONGINI E, FREEDHOLM BB. Pharmacology of adenosine A_{2A} receptors. *Trends Pharmacol Sci* 17: 364-372, 1996.
- DORNAS WC, OLIVEIRA TT, RODRIGUES-DAS-DORES RG, SANTOS AF, NAGEM TJ. Flavonóides: potencial terapêutico no estresse oxidativo. *Rev Ciênc Farm Básica Apl* 28: 241-249, 2007.

- ONISHCHENKO N, TAMM C, VAHTER M, HÖKFELT T, JOHNSON JA, JOHNSON DA, CECCATELLI S. Developmental exposure to methylmercury alters learning and induces depression-like behavior in male mice. *Toxicol Sci* 97: 428-437, 2007.
- ONISHCHENKO N, KARPOVA N, SABRI F, CASTRÉN E, CECCATELLI S. Long-lasting depression-like behavior and epigenetic changes of BDNF gene expression induced by perinatal exposure to methylmercury. *J Neurochem* 106: 1378-1387, 2008.
- OZEL TURKCU U, BILGIHAN A, BIBEROGLU G, MERTOGLU CAGLAR O. Carnosine supplementation protects rat brain tissue against ethanol-induced oxidative stress. *Mol Cell Biochem* 339: 55-61, 2010.
- PAGLIA DE, VALENTINE WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med* 70: 158-169, 1967.
- PALHETA DC. Investigations of the Content of Total and Inorganic Mercury in Environmental and Biological Samples from a Gold Mining Area in the Amazon Region of Brazil. M. Sc. Thesis. Surrey, England: University of Surrey, School of Biological Science, 1993.
- PAPANDREOU MA, KANAKIS CD, POLISSIOU MG, EFTHIMIOPOULOS S, CORDOPATIS P, MARGARITY M, LAMARI FN. Inhibitory activity on amyloid-beta aggregation and antioxidant properties of *Crocus sativus* stigmas extract and its crocin constituents. *J Agric Food Chem* 54: 8762-8768, 2006.
- PASSINGHAM RE. Rates of brain development in mammals including man. *Brain Behav Evol* 26: 167-175, 1985.
- PEKKANEM TJ, SANDHOLM M. The effect of experimental methylmercury poisoning on the activity of TPNH-specific glutathione reductase of the rat brain and liver. *Acta Vet Scand* 13: 14-19, 1972.
- PELLOW S, CHOPIN P, FILE SE, BRILEY M. Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J Neurosci Methods* 14: 149-167, 1985.
- PETRONILLI V, COLA C, BERNARDI P. Modulation of the mitochondrial cyclosporine A-sensitive permeability transition pore. II. The minimal requirements for pore induction underscore a key role for transmembrane electrical potential, matrix pH and matrix Ca^{2+} . *J Biol Chem* 268: 1011-1016, 1993.
- PINHEIRO MC, MACCHI BM, VIEIRA JL, OIKAWA T, AMORAS WW, GUIMARÃES GA, COSTA CA, CRESPO-LÓPEZ ME, HERCULANO AM, SILVEIRA LC, DO NASCIMENTO JL. Mercury exposure and antioxidant defenses in women: a comparative study in the Amazon. *Environ Res* 107: 53-59, 2008.
- PITSIKAS N, SAKELLARIDIS N. *Crocus sativus* L. extracts antagonize memory impairments in different behavioural tasks in the rat. *Behav Brain Res* 173:112-115, 2006.

- PITSIKAS N, ZISOPOULOUS S, TARANTILIS PA, KANAKIS CD, POLISSIOU MG, SAKELLARIDIS N. Effects of the active constituents of *Crocus sativus* L., crocins on recognition and spatial rats' memory. *Behav Brain Res* 183: 141-146, 2007.
- POLLARDI I. Neuropharmacology of drugs and alcohol in mother and fetus. *Semin Fetal Neonatal Med* 12:106-113, 2007.
- PORSOLT RD, BERTIN A, JALFRE M. Behavioural despair in mice: a primary screening test for antidepressants. *Arch Intern Pharmacodynam* 229: 327-336, 1977.
- PORSOLT RD, ANTON G, BLAVET N, JALFRE M. Behavioural despair in rats: A new model sensitive to antidepressants treatment. *Eur J Pharmacol* 47: 379-391, 1978.
- POTTERAT O, HAMBURGER M. Drug discovery and development with plant-derived compounds. *Progr Drug Res* 65: 47-118, 2008.
- PREDIGER RD. Effects of Caffeine in Parkinson's Disease: From Neuroprotection to the Management of Motor and Non-Motor Symptoms. *J Alzheimers Dis* 20: S205-S220, 2010.
- PREDIGER RD, TAKAHASHI RN. Ethanol improves short-term social memory in rats. Involvement of opioid and muscarinic receptors. *Eur J Pharmacol* 462: 115-123, 2003.
- PREDIGER RDS, TAKAHASHI RN. Modulation of short-term memory in rats by adenosine A1 and A2 receptors. *Neurosci Lett* 376: 160-165, 2005.
- PREDIGER RD, BATISTA LC, TAKAHASHI RN. Caffeine reverses age-related deficits in olfactory discrimination and social recognition memory in rats. Involvement of adenosine A1 and A2A receptors. *Neurobiol Aging* 26: 957-964, 2005a.
- PREDIGER RD, DA CUNHA C, TAKAHASHI RN. Antagonistic interaction between adenosine A2A and dopamine D2 receptors modulates the social recognition memory in reserpine-treated rats. *Behav Pharmacol* 16: 209-218, 2005b.
- PREDIGER RD, FERNANDES MS, RIAL D, WOPEREIS S, PEREIRA VS, BOSSE TS, DA SILVA CB, CARRADORE RS, MACHADO MS, CECHINEL-FILHO V, COSTA-CAMPOS L. Effects of acute administration of the hydroalcoholic extract of mate tea leaves (*Ilex paraguariensis*) in animal models of learning and memory. *J Ethnopharmacol* 8: 120: 465-73, 2008.
- RANSOM B, BEHAR T, NEDEGAARD M. New roles for astrocytes (stars at last). *Trends Neurosci* 26: 620-622, 2003.
- RASMUSSEN SA, ERICKSON JD, REEF SE, ROSS DS. Teratology: From science to birth defects prevention. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 85: 82-92, 2009.
- RAVENNA P. Revisional studies in the genus *Cipura* (Iridaceae). *Onira* 1: 35-43, 1988.

- REDROBE JP, BOURIN M. Dose-dependent influence of buspirone on the activities of selective serotonin reuptake inhibitors in the mouse forced swimming test. *Psychopharmacology* 138: 198-206, 1998.
- REITER RJ. Oxidative processes and oxidative defense mechanism in the aging brain. *FASEB J* 9: 526-533, 1995.
- RODRIGUES RM, MASCARENHAS AFS, ICHIARA AH, SOUZA TMC, BIDONE ED, BELLA V, HACON S, SILVA ARB, BRAGA YBP, STILIANIDI FB. Estudos dos impactos ambientais decorrentes do extrativismo mineral e poluição mercurial no Tapajós: pré-diagnóstico. Rio de Janeiro: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Centro de Tecnologia Mineral (CETEM), 1994.
- ROESLER R, WALZ R, QUEVEDO J, DE-PARIS F, ZANATA SM, GRANER E, IZQUIERDO I, MARTINS VR, BRENTANI RR. Normal inhibitory avoidance learning and anxiety, but increased locomotor activity in mice devoid of PrP(C). *Brain Res Mol Brain Res* 71: 349-353, 1999.
- ROOS DH, PUNTEL RL, SANTOS MM, SOUZA DO, FARINA M, NOGUEIRA CW, ASCHNER M, BURGER ME, BARBOSA NB, ROCHA JB. Guanosine and synthetic organoselenium compounds modulate methylmercury-induced oxidative stress in rat brain cortical slices: Involvement of oxidative stress and glutamatergic system. *Toxicol In Vitro* 23: 302-307, 2009.
- ROWLAND I, DAVIES M, EVANS J. Tissue content of mercury in rats given methylmercury chloride orally: influence of intestinal flora. *Arch Env Health* 35: 155-160, 1980.
- SAKAKIBARA H, ISHIDA K, IZAWA Y, MINAMI Y, SAITO S, KAWAI Y, BUTTERWECK V, TAMAKI T, NAKAYA Y. Effects of forced swimming stress on rat brain function. *J Med Invest* 52: 300-301, 2005.
- SALEEM S, AHMAD M, AHMAD AS, YOUSUF S, ANSARI MA, KHAN MB, ISHRAT T, ISLAM F. Effect of Saffron (*Crocus sativus*) on neurobehavioral and neurochemical changes in cerebral ischemia in rats. *J Med Food* 9: 246-253, 2006.
- SANTOS EC, DE JESUS IM, BRABO ES, LOUREIRO EC, MASCARENHAS AF, WEIRICH J, CÂMARA VM, CLEARY D. Mercury exposures in riverside Amazon communities in Pará, Brazil. *Environm Res* 84: 100-107, 2000.
- SARRIS J, KAVANAGH DJ. Kava and St. John's Wort: current evidence for use in mood and anxiety disorders. *J Altern Complement Med* 15:827-836, 2009.
- SCHMIDT M, BETTI G, HENSEL A. Saffron in phytotherapy: pharmacology and clinical uses. *Wien Med Wochenschr* 157: 315-319, 2007.
- SCHUCKIT MA. Alcohol-use disorders. *Lancet* 373: 492-501, 2009.
- SEBASTIÃO AM, RIBEIRO JA. Fine-tuning neuromodulation by adenosine. *TIPS* 21: 341-346, 2000.

- SENGUPTA J, SEN S. Karyological analysis of culture cells and regenerated plants of *Cipura paludosa* Aubl. (Iridaceae) – A structural hybrid. *Bull. Torrey Botan Club* 115: 280-289, 1988.
- SHANKER G, ASCHNER M. Methylmercury-induced reactive oxygen species formation in neonatal cerebral astrocytic cultures is attenuated by antioxidants. *Mol Brain Res* 110: 85-91, 2003.
- SHEARER J, SZALAI VA. The amyloid-beta peptide of Alzheimer's disease binds Cu(I) in a linear bis-his coordination environment: insight into a possible neuroprotective mechanism for the amyloid-beta peptide. *J Am Chem Soc* 130: 17826-17835, 2008.
- SIMPSON PB, RUSSELL JT. Mitochondrial Ca^{2+} uptake and release influence metabotropic and ionotropic cytosolic Ca^{2+} responses in rat oligodendrocyte progenitors. *J Physiol* 508: 413–426, 1998.
- SONE N, LARSSTUVOLD MK, KAGAWA Y. Effect of methyl mercury on phosphorylation, transport and oxidation in mammalian mitochondria. *J Biochem* 82: 859-868, 1977.
- SPETHMANN CN. Medicina alternativa de A a Z, 6th ed. Uberlândia, MG, 2003; pp.292.
- STREISSGUTH AP, BARR HM, SAMPSON PD. Moderate prenatal alcohol exposure: effects on child IQ and learning problems at age 7 1/2 years. *Alcohol Clin Exp Res* 14: 662-669, 1990.
- STREISSGUTH AP, BARR HM, KOGAN J, BOOKSTEIN FL. Primary and secondary disabilities in fetal alcohol syndrome, in *The Challenge of Fetal Alcohol Syndrome: Overcoming Secondary Disabilities*. Edited by Streissguth AP, Kanter J. Seattle, University of Washington Press, 1997, pp 25–39.
- SUGIURA M, SHOYAMA Y, SAITO H, ABE K. Crocin (crocetin di-gentiobiose ester) prevents the inhibitory effect of ethanol on long-term potentiation in the dentate gyrus in vivo. *J Pharmacol Exp Ther* 271: 703-707, 1994.
- SUGIURA M, SHOYAMA Y, SAITO H, ABE K. Ethanol extract of *Crocus sativus* L. antagonizes the inhibitory action of ethanol on hippocampal long-term potentiation in-vivo. *Phytother Res* 9: 100-104, 1995.
- TAKEGAMI T, SIMAMURA E, HIRAI K, KOYAMA J. Inhibitory effect of furanonaphthoquinone derivatives on the replication of Japanese encephalitis virus. *Antiviral Res* 37: 37-45, 1998.
- TAMASHIRO H, ARAKAKI M, AKAGI H, MURAO K, HIRAYAMA K, SMOLENSKY MH. Effects of ethanol on methyl mercury toxicity in rats. *J Toxicol Environ Health* 18: 595-605, 1986.
- TCHOUNWOU PB, AYENSU WK, NINASHVILI N, SUTTON D. Environmental exposure to mercury and its toxicopathologic implications for public health. *Environ Toxicol* 18: 149-175, 2003.

- TERRANOVA JP, STORME JJ, LAFON N, PÉRIO A, RINALDI-CARMONA M, LE FUR G, SOUBRIÉ P. Improvement of memory in rodents by the selective CB1 cannabinoid receptor antagonist, SR141716. *Psychopharmacology* 126: 165-172, 1996.
- THORP AA, SINN N, BUCKLEY JD, COATES AM, HOWE PR. Soya isoflavone supplementation enhances spatial working memory in men. *Br J Nutr* 102:1348-54, 2009.
- TOBAMIDANIK L, ZABKIEWICZ D. Indicators of sense of coherence and alcohol consumption-related problems: the 2000 U.S. National alcohol survey. *Subst Use Misuse* 44: 357-373, 2009.
- TREIT D, MENARD J, ROYAN C. Anxiogenic stimuli in the elevated plus-maze. *Pharmacol Biochem Behav* 44: 463-469, 1993.
- TURNER CJ, BHATNAGAR MK, YAMASHITA S. Etanol potentiation of methyl mercury toxicity.: a preliminary report. *J Toxicol Environ Health* 7: 655-668, 1981.
- UCHIYAMA M, MIHARA M. Determination of malonaldehyde in tissues by thiobarbituric acid test. *Anal Biochem* 86: 271-278, 1978.
- VAKILI A, TAYEBI K, JAFARI MR, ZARRINDAST MR, DJAHANGUIRI B. Effect of ethanol on morphine state-dependent learning in the mouse: involvement of GABAergic, opioidergic and cholinergic systems. *Alcohol Alcohol* 39: 427-432, 2004.
- VIANA AF, MACIEL IS, MOTTA EM, LEAL PC, PIANOWSKI L, CAMPOS MM, CALIXTO JB. Antinociceptive activity of *Trichilia catigua* hydroalcoholic extract: New Evidence on its dopaminergic effects. *Evid Based Complement Alternat Med* 2009 [In Press].
- WANG Y, HAN T, ZHU Y, ZHENG CJ, MING QL, RAHMAN K, QIN LP. Antidepressant properties of bioactive fractions from the extract of *Crocus sativus* L. *J Nat Med* 64: 24-30, 2010.
- WEI YC, ZHOUB FL, HEA DL, BAIC JR, HUIA LY, WANGA XY, NAN KJ. The level of oxidative stress and the expression of genes involved in DNA-damage signaling pathways in depressive patients with colorectal carcinoma. *J Psychosom Res* 66: 259-266, 2009.
- WENDEL A. Glutathione peroxidase. *Methods Enzymol* 77: 325-333, 1981.
- WILL ED. Lipid peroxide formation in microsomes. General consideration. *Biochem J* 113: 315-324, 1969.
- WILLFORD JA, RICHARDSON GA, LEECH SL, DAY NL. Verbal and visuospatial learning and memory function in children with moderate prenatal alcohol exposure. *Alcohol Clin Exp Res* 28: 497-507, 2004.
- WILLIAMSON JD, VELLAS B, FURBERG C, NAHIN R, DEKOSKY ST. Comparison of the design differences between the Ginkgo Evaluation of Memory study and the GuidAge study. *J Nutr Health Aging* 12: 73S-79S, 2008.

- WILMOTT RW. Characteristics of fetal alcohol syndrome. *J Pediat* 145: A1, 2004.
- YIN Z, MILATOVIC D, ASCHNER JL, SYVERSEN T, ROCHA JB, SOUZA DO, SIDORYK M, ALBRECHT J, ASCHNER M. Methylmercury induces oxidative injury, alterations in permeability and glutamine transport in cultured astrocytes. *Brain Res* 1131:1-10, 2007.
- ZHANG Y, SHOYAMA Y, SUGIURA M, SAITO H. Effects of *Crocus sativus* L. on the ethanol-induced impairment of passive avoidance performances in mice. *Biol Pharm Bull* 17: 217–221, 1994.
- ZHANG P, XU Y, SUN J, LI X, WANG L, JIN L. Protection of pyrroloquinoline quinone against methylmercury-induced neurotoxicity via reducing oxidative stress. *Free Radic Res* 43: 224-233, 2009.
- ZANOLI P, CANNAZZA G, BARALDI M. Prenatal exposure to methyl mercury in rats: focus on changes in kynurenine pathway. *Brain Res Bull* 55: 235-238, 2001.
- ZHENGXIONG C, HUIZHU H, CHENGRUUI W, YUHUI L, JIANMI D, SANKAWA U, NOGUCHI H, IITAKA Y. Hongconin, a new naphthalene derivative from the rhizome of *Eleutherine americana* (Hong-Cong). *Heterocycles* 22: 691-694, 1984.
- ZIMA T, KALOUSOVÁ M. Oxidative stress and signal transduction pathways in alcoholic liver disease. *Alcohol Clin Exp Res* 29:110S-115S, 2005.

VII. ANEXOS

***COMPROVANTES
CEUA***



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA – UnB
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICA - IBDB
COMITÊ DE ÉTICA NO USO ANIMAL - CEUA

29 de junho de 2005.

A QUEM POSSA INTERESSAR

Declaramos que o projeto intitulado “**INTERAÇÃO ÁLCOOL X METILMERCÚRIO: UM FATOR DE RISCO NA GRAVIDEZ**”, foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso Animal (CEUA) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'V. Garrafa', is positioned above the printed name of the signatory.

Prof. Volnei Garrafa
Presidente do CEUA



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA - UnB
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - IB
COMITÊ DE ÉTICA NO USO ANIMAL - CEUA

Brasília, 29 de novembro de 2005.

DECLARAÇÃO

Declaramos que o projeto intitulado “**ÁVALIAÇÃO DAS PROVÁVEIS ATIVIDADES CENTRAIS E DO MECANISMO DE AÇÃO DE PLANTAS DO GÊNERO CIPURA (IRIDACEAE)**” sob responsabilidade da Profa. Vania Maria Moraes Ferreira, foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso Animal (CEUA) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília.


Prof. Anamélia Lorenzetti Bocca
Coordenadora do CEUA

***ARTIGOS
PUBLICADOS***
