

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

SUSI MARA SOECKI SBORGI

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANSIOLÍTICA E DO POSSÍVEL MECANISMO DE
AÇÃO DO ÁCIDO FERÚLICO EM *ZEBRAFISH***

PONTA GROSSA

2018

SUSI MARA SOECKI SBORGI

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANSIOLÍTICA E DO POSSÍVEL MECANISMO DE
AÇÃO DO ÁCIDO FERÚLICO EM *ZEBRAFISH***

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Ciências Biomédicas, na Universidade Estadual de Ponta Grossa, Área de Fisiologia e Fisiopatologia.

Orientador: Prof. Dr. Edmar Miyoshi

PONTA GROSSA

2018

S276 Sborgi, Susi Mara Soecki
Avaliação da atividade ansiolítica e do possível mecanismo de ação do ácido ferúlico em zebrafish/ Susi Mara Soecki Sborgi. Ponta Grossa, 2018. 56f.

Dissertação (Mestrado em Ciências Biomédicas - Área de Concentração: Fisiologia e Fisiopatologia), Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientador: Prof. Dr. Edmar Miyoshi.

1. Ansiedade. 2. Ácido ferúlico. 3. Zebrafish. I. Miyoshi, Edmar. II. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Mestrado em Ciências Biomédicas. III. T.

CDD: 616.98



Universidade Estadual
de Ponta Grossa

Programa de
Pós Graduação
em Ciências Biomédicas



ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NÍVEL DE MESTRADO EM CIÊNCIAS BIOMÉDICAS – ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: FISIOLOGIA E FISIOPATOLOGIA, NÚMERO DA ATA 03/2018, DA MESTRANDA SUSI MARA SOECKI SBORGI REALIZADO NO DIA 23 DE FEVEREIRO DE 2018, NA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA.

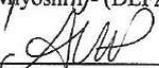
Aos vinte e três dias de fevereiro de dois mil e dezoito, às 14hs00min, na sala 93, bloco M, da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG) em seção pública sob a presidência do **Professor Dr. Edmar Miyoshi** reuniu-se a Banca Examinadora de defesa da Dissertação de Mestrado em Ciências Biomédicas da mestranda **Susi Mara Soecky Sborgi** na linha de pesquisa; Fisiopatologia do Sistema Nervoso Central, constituída pelos demais Doutores (membros titulares): **Professor Dr. Airton Vicente Pereira (UEPG/Pr)** e **Professora Dra. Débora Dalla Vecchia (FAPAR/UNINTER)** Iniciados os trabalhos, a presidência deu conhecimento aos membros da banca e a candidata das normas que regem a defesa da dissertação de Mestrado e definiu - se a ordem a ser seguida pelos examinadores para arguição. O título da dissertação avaliada foi: “**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANSIOLÍTICA E DO POSSÍVEL MECANISMO DE AÇÃO DO ÁCIDO FERÚLICO EM ZEBRAFISH.**” Encerrado a defesa, e após reunião, a comunicou o resultado final da avaliação da dissertação como aprovada considerado requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biomédicas. A aluna deverá entregar, no prazo estipulado no item 8 da IN 01/2015, referente a defesa de dissertação do programa com as modificações sugeridas pelos membros da banca examinadora. Para a obtenção do título de mestre, o aluno terá até 6 meses, após a data da defesa da sua dissertação, para apresentar ao colegiado a carta de submissão do seu artigo em revista indexada no estrato mínimo B3 dentre os periódicos indicados pela área de Ciências Biológicas II vigente. Nada mais havendo a ser tratado, lavrou-se a presente ata que vai assinada pelos membros da Banca Examinadora.

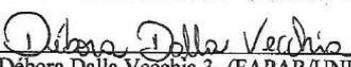
Observações (se necessário): _____

Alteração de título: sim não

Novo título: _____


Edmar Miyoshi 1 - (DEFAR - UEPG) - Presidente


Airton Vicente Pereira 2 - (DEFAR - UEPG) – Titular


Débora Dalla Vecchia 3- (FAPAR/UNINTER) – Titular

Ponta Grossa, 23 de fevereiro de 2018.

Dedico esse trabalho ao meu esposo Daniel, que esteve ao meu lado em todos os momentos, me apoiando, incentivando e compreendendo. Minha conquista também é sua.

Aos meus pais Miguel Dirceu e Filomena, que nunca mediram esforços para que eu alcançasse meus objetivos e me ensinaram os melhores princípios e valores. Obrigada por tudo sempre.

Ao meu filho Luca, que ainda no meu ventre, já me ensinou tantas coisas e trouxe mais alegria para minha vida.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Edmar Miyoshi**, por acreditar e confiar em mim, por ser inspiração e exemplo, pela paciência em todos os momentos, pela atenção, pelas palavras de incentivo, por não me deixar desanimar nem no momento mais difícil, por toda contribuição e por compartilhar seus conhecimentos. Você é mais que um orientador, é um amigo.

Ao meu esposo, **Daniel**, que acreditou mais em mim do que eu mesma. Que me apoiou desde o início, compreendeu os momentos de ausência e tornou essa jornada mais leve. Sem sua compreensão e incentivo eu não conseguiria chegar até aqui.

Aos meus pais **Filomena** e **Miguel Dirceu**, que nunca mediram esforços para que eu conseguisse conquistar meus objetivos. Meus primeiros incentivadores que desde o início da minha alfabetização me ensinaram o caminho da leitura e o gosto pelo aprendizado. Eles, que fizeram sacrifícios para que eu pudesse ingressar no curso que eu realmente queria e fora da cidade deles. Mãe e pai, sou eternamente grata a vocês.

Agradeço também ao meu irmão **Fernando**, minha cunhada **Rita** e aos meus sogros **Antônio Marcos** e **Rosangela**, por compreenderem os momentos de ausência devido aos compromissos do mestrado.

Às minhas amigas **Elis** e **Carla**, que já passaram por todo o processo do mestrado e sempre me incentivaram a continuar.

Às minhas amigas **Bruna** e **Patrícia** que desde a decisão de tentar ingressar no mestrado estiveram ao meu lado.

À minha amiga **Priscila**, que me ajudou a estudar para a prova do mestrado e pelos conselhos.

Aos meus colegas de laboratório **Anderson**, **Lillian** e **Ana Paula**, pelos conhecimentos compartilhados, pelas boas conversas, pelos desabafos e pela ajuda.

A **Universidade Estadual de Ponta Grossa**, por toda estrutura fornecida.

A todos os **Professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biomédicas**, por todo conhecimento passado durante as aulas.

A professora **Dionizia** e ao professor **Airton** pelas contribuições feitas na banca de qualificação que ajudaram a melhorar esse trabalho.

Ao **Jonas**, secretário do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biomédicas, por ser tão solícito sempre que precisei.

Agradeço também ao **Hospital Universitário Regional dos Campos Gerais**, **Prof. Dr. Everson Augusto Krum**, **Dr. Délcio Caran Bertucci Filho** e **Dr. Thomas Markus D'Haese** onde e com quem desenvolvi meu primeiro projeto de pesquisa. Obrigada por acreditarem em meu trabalho e tentarem desenvolvê-lo comigo.

E, finalmente, à **Fundação Araucária** pelo suporte financeiro.

A melhor maneira de nos prepararmos para o futuro é concentrar toda a imaginação e entusiasmo na execução perfeita do trabalho de hoje.

Dale Carnegie

RESUMO

SBORGI, SUSI MARA SOECKI. **Avaliação da atividade ansiolítica e do possível mecanismo de ação do ácido ferúlico em *zebrafish***. 56 f. 2018. Dissertação (Mestrado em Ciências Biomédicas) – Universidade Estadual de Ponta Grossa. Ponta Grossa, 2018.

Os distúrbios de ansiedade pertencem a um grupo de transtornos mentais onde os pacientes apresentam medo e preocupação excessivos. A prevalência dessa patologia vem aumentando no decorrer dos anos e tende a aumentar ainda mais nos próximos. Estudos afirmam que o estresse oxidativo é um processo fisiopatológico importante envolvido nesses transtornos, assim como a desregulamentação do sistema gabaérgico. Dessa forma, a pesquisa de substâncias que possam reduzir esses sintomas torna-se interessante, uma vez que os tratamentos já existentes nem sempre são eficazes aos pacientes. Estudos com ácido ferúlico têm demonstrado resultados positivos para tratar sintomas depressivos e por esse motivo, o fármaco foi escolhido para ter a atividade ansiolítica e seu possível mecanismo de ação avaliados em *zebrafish*. Para isso, foi realizado o teste de preferência claro/escuro após exposição dos animais ao ácido ferúlico, clonazepam ou fluoxetina, a fim de comparar o comportamento dos animais e verificar a ação ansiolítica dessa substância. Já para sugerir o possível mecanismo de ação, foi realizado o pré-tratamento com flumazenil, seguido do tratamento com o ácido ferúlico e/ou controle positivo, com posterior realização do mesmo teste. No teste de preferência claro/escuro, os animais tratados com clonazepam 0,75 mg/L, fluoxetina 10 mg/L, ácido ferúlico 250 e 500 mg/L, permaneceram mais tempo no lado claro em comparação aos animais não tratados. A latência para a primeira entrada no compartimento escuro também foi maior nos grupos tratados com fluoxetina 10 mg/L, ácido ferúlico 250 e 500 mg/L, quando comparados ao grupo controle. Na avaliação do possível mecanismo de ação, o tempo de permanência no compartimento claro dos animais pré-tratados com flumazenil 1,25 mg/L seguido de tratamento com ácido ferúlico 500 mg/L, diminuiu significativamente se comparado ao grupo sem pré-tratamento. Os resultados encontrados sugerem atividade ansiolítica e possível mecanismo de ação ligado ao sítio de ligação benzodiazepínico do receptor GABA_A.

Palavras-chave: Ansiedade. Ácido ferúlico. *Zebrafish*.

ABSTRACT

SBORGI, SUSI MARA SOECKI. **Evaluation of anxiolytic activity and possible mechanism of action of ferulic acid in zebrafish.** 56 f. 2018. Dissertação (Mestrado em Ciências Biomédicas) – Universidade Estadual de Ponta Grossa. Ponta Grossa, 2018.

Anxiety disorders belong to a group of mental disorders in which the patients present excessive fear and worry. The prevalence of this pathology has been increasing over the years and tends to increase even more in the coming years. Studies have stated that oxidative stress is an important pathophysiological process involved in these disorders, as well as the deregulation of the gabaergic system. In this way, the research for substances that can reduce these symptoms becomes interesting, since the existing treatments are not always effective for the patients. Studies with ferulic acid have shown positive results to treat depressive symptoms and for this reason, the drug was chosen to have the anxiolytic activity and its possible mechanism of action evaluated in zebrafish. For this, the light/dark preference test was performed after exposure of the animals to ferulic acid, clonazepam or fluoxetine, in order to compare the behavior of the animals and verify the anxiolytic action of this substance. In order to suggest the possible mechanism of action, pre-treatment with flumazenil was performed, followed by treatment with ferulic acid and/or positive control, after which the same test was performed. In the light/dark preference test, the animals treated with clonazepam 0.75 mg/L, fluoxetine 10 mg/L, ferulic acid 250 and 500 mg/L, remained more time on the light side compared with untreated animals. The latency for the first entry into the dark compartment was also longer in the groups treated with fluoxetine 10 mg/L, ferulic acid 250 and 500 mg/L, when compared with the control group. In the mechanism of action test, the dwell time in the clear compartment of the animals pretreated with flumazenil 1.25 mg/L followed by treatment with ferulic acid 500 mg/L, decreased significantly compared with the group without pre-treatment. The results suggest an anxiolytic activity and mechanism of action linked to the benzodiazepine binding site of the GABA_A receptor.

Keywords: Anxiety. Ferulic acid. *Zebrafish*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Algoritmo de tratamento dos transtornos de ansiedade.....	17
Figura 2 - Estrutura química e síntese do ácido ferúlico e compostos relacionados em plantas.....	19
Figura 3 - Peixe <i>Danio rerio</i>	23
Figura 4 - Sistema de estresse neuroendócrino do zebrafish	25
Figura 5 - Dinâmica de tempo de respostas típicas do cortisol ao estresse agudo em humanos e <i>zebrafish</i>	25
Figura 6 - Fluxograma dos experimentos	31
Figura 7 - Aparato experimental para execução do teste claro-escuro em <i>zebrafish</i>	32
Gráfico 1 - Tempo de permanência no ambiente claro	34
Gráfico 2 - Latência para a primeira entrada no compartimento escuro.....	35
Gráfico 3 - Número de cruzamentos entre os compartimentos claro e escuro.....	36
Gráfico 4 - Tempo de permanência no lado claro após tratamento com clonazepam e/ou flumazenil seguido de clonazepam	37
Gráfico 5 - Latência para primeira entrada no compartimento escuro após tratamento com clonazepam e/ou flumazenil seguido de clonazepam	37
Gráfico 6 - Número de cruzamentos entre os compartimentos após tratamento com clonazepam e/ou flumazenil seguido de clonazepam	38
Gráfico 7 - Tempo de permanência no lado claro após tratamento com fluoxetina e/ou flumazenil seguido de fluoxetina	39
Gráfico 8 - Latência para primeira entrada no compartimento escuro após tratamento com fluoxetina e/ou flumazenil seguido de fluoxetina	39
Gráfico 9 - Número de cruzamentos entre os compartimentos após tratamento com fluoxetina e/ou flumazenil seguido de fluoxetina	40
Gráfico 10 - Tempo de permanência no compartimento claro após tratamento com AF e/ou flumazenil seguido de AF	41
Gráfico 11 - Latência para primeira entrada no compartimento escuro após tratamento com AF e/ou flumazenil seguido de AF.....	41
Gráfico 12 - Número de cruzamentos entre os compartimentos após tratamento com AF e/ou flumazenil seguido de AF.....	42

LISTA DE SIGLAS

ACTH	Hormônio Adrenocorticotrópico
AF	Ácido Ferúlico
BZD	Benzodiazepínico
CRH	Corticotropina
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DSM-V	Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais
ERN	Espécie Reativa de Nitrogênio
ERO	Espécie Reativa de Oxigênio
GABA	Ácido Gama-Aminobutírico
HPA	Hipotálamo-Hipófise-Adrenal
HPI	Hipotálamo-Hipófise-Inter-renal
ISRS	Inibidor Seletivo da Recaptação de Serotonina
NO	Óxido Nítrico
NOS	Óxido Nítrico Sintase
NOS _e	Óxido Nítrico Sintase Endotelial
NOS _i	Óxido Nítrico Sintase Induzível
NOS _n	Óxido Nítrico Sintase Neural
RNA	Ácido Ribonucleico
SNC	Sistema Nervoso Central
TAG	Transtorno de Ansiedade Generalizada
TDM	Transtorno Depressivo Maior
TEPT	Transtorno de Estresse Pós-Traumático
TOC	Transtorno Obsessivo Compulsivo

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1 TRANSTORNOS DE ANSIEDADE	15
2.2 TRATAMENTO DOS TRANSTORNOS DE ANSIEDADE.....	16
2.3 ÁCIDO FERÚLICO.....	19
2.3.1 Farmacocinética do ácido ferúlico.....	20
2.3.2 Ácido ferúlico e efeitos comportamentais.....	21
2.4 ZEBRAFISH COMO MODELO DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL.....	22
2.4.1 Zebrafish e ansiedade.....	24
3 OBJETIVOS	27
3.1 GERAL.....	27
3.2 ESPECÍFICOS	27
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	28
4.1 ASPECTOS ÉTICOS	28
4.2 ANIMAIS	28
4.3 TRATAMENTO	28
4.3.1 Fármacos	28
4.3.2 Teste de atividade ansiolítica	29
4.3.3 Envolvimento do sistema gabaérgico no mecanismo de ação do AF	29
4.4 TESTE CLARO/ESCURO.....	31
4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	32
5 RESULTADOS	34
5.1 TESTE DE ATIVIDADE ANSIOLÍTICA	34
5.2 ENVOLVIMENTO DO SISTEMA GABAÉRGICO NO MECANISMO DE AÇÃO DO AF	36
6 DISCUSSÃO	43

6.1 TESTE DE ATIVIDADE ANSIOLÍTICA	43
6.2 ENVOLVIMENTO DO SISTEMA GABAÉRGICO NO MECANISMO DE AÇÃO DO AF	46
7 CONCLUSÃO.....	50
REFERÊNCIAS.....	51

1 INTRODUÇÃO

Com o passar dos anos, uma mudança demográfica em direção a idade mais avançada que começou há gerações, atingirá seu pico, e em 2050, 2 bilhões de indivíduos terão mais de 60 anos. Sabe-se que os transtornos mentais comuns como ansiedade e depressão causam sofrimentos ao paciente e sua família, e com o aumento da idade tornam-se cada vez mais deletérios para a saúde e cognição, e aumentam a mortalidade em idosos. A patologia é um crescente fardo humano e econômico. Sabendo disso, entende-se a importância de compreender melhor esses transtornos mentais e buscar novas terapias (LENZE; WETHERELL, 2011).

A necessidade de descoberta de novos fármacos para tratamentos de doenças que atingem o sistema nervoso central (SNC) é clara, visto que os tratamentos já existentes para os tratamentos de epilepsia e ansiedade, por exemplo, nem sempre tem eficácia ótima (SHAMS et al., 2017).

Os distúrbios neuropsiquiátricos muitas vezes não possuem terapias efetivas. A identificação de biomarcadores clinicamente relevantes, os mecanismos neurobiológicos subjacentes e os fatores genéticos e ambientais da psicopatologia são passos críticos na descoberta de tratamentos eficazes. Os modelos de estudos utilizando roedores para pesquisa de distúrbios cerebrais humanos têm sido empregados há muito tempo, porém apresentam altos custos. O *Danio rerio* tem recebido atenção como um modelo animal poderoso para uma ampla gama de distúrbios do cérebro humano. Ele é uma espécie de vertebrado aquático pequeno, de baixo custo e geneticamente tratável com alto grau de homologia morfológica, fisiológica e genética com humanos. Seu genoma é completamente sequenciado e mostra ortólogos correspondentes a aproximadamente 82% dos genes relacionados à doença em seres humanos (KHAN et al., 2017).

Para avançar o tratamento de transtornos neurológicos, é necessário o desenvolvimento de pesquisas que avaliem novas moléculas com maior eficácia terapêutica do que os fármacos já existentes. Os compostos obtidos das plantas representam uma ótima oportunidade para a descoberta de novas substâncias com potencial terapêutico (MACHADO et al., 2015).

Em condições fisiológicas, há um equilíbrio nas quantidades de espécies reativas de oxigênio (EROs) e nitrogênio (ERNs), também chamados de radicais

livres, que são resultado do metabolismo celular aeróbio normal e moléculas ou enzimas antioxidantes que modulam esses radicais. O sistema antioxidante desempenha seu papel de prevenção de danos que podem ser causados pelos radicais livres. No entanto, o mecanismo de defesa desequilibrado dos antioxidantes, a superprodução ou a incorporação de radicais livres no organismo levam à neurodegeneração. As células neurais sofrem perda funcional ou sensorial em doenças neurodegenerativas (UTTARA et al., 2009).

Steenkamp et al. (2017) avaliaram a relação entre o estresse oxidativo e a gravidade da depressão e sintomas de ansiedade em indivíduos com transtorno depressivo maior (TDM). Para isso, os pesquisadores avaliaram marcadores plasmáticos de estresse oxidativo em indivíduos com TDM, fisicamente saudáveis e sem uso de medicamentos e concluíram que o estresse oxidativo está mais relacionado à ansiedade do que com os sintomas de depressão. Outro fator relacionado ao aumento da ansiedade é a desregulamentação do sistema gabaérgico (OLEXOVÁ; STEFÁNIK; KRŠKOVÁ, 2016).

Estudos tem sugerido que o ácido ferúlico (AF), um composto fenólico presente em muitos alimentos básicos, tem ação antidepressiva, principalmente em roedores. Os fármacos antidepressivos são amplamente usados no tratamento de transtornos de ansiedade. Dessa forma, o AF foi escolhido para ter sua atividade ansiolítica e o possível mecanismo de ação avaliados, utilizando o peixe *Danio rerio* como modelo experimental.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 TRANSTORNOS DE ANSIEDADE

O desenvolvimento de formas brandas de ansiedade fisiológica e respostas neurovegetativas e/ou cognitivas ao estresse representam um passo evolutivo adaptativo contra ameaças ambientais (externas) ou auto desencadeadas (internas), mas as reações exageradas também surgiram na evolução humana. Os distúrbios de ansiedade são condições inadequadas em que respostas desproporcionais ao estresse são exibidas. Os distúrbios de ansiedade fazem parte das doenças psiquiátricas mais frequentes (BRADY et al., 2012).

Segundo o DSM-V (Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais) os transtornos de ansiedade incluem aqueles com características de medo e ansiedade excessivos e perturbações comportamentais relacionadas. Sendo o medo uma resposta emocional a ameaça iminente real ou percebida, e a ansiedade uma antecipação de ameaça futura. Os transtornos de ansiedade diferem entre si nos tipos de objetos ou situações que são temidos ou evitados e pelo conteúdo dos pensamentos ou crenças associadas (American Psychiatric Association, 2014).

“Os distúrbios de ansiedade referem-se a um grupo de transtornos mentais caracterizados por sentimentos de ansiedade e medo, incluindo transtorno de ansiedade generalizada (TAG), transtorno de pânico, fobias, transtorno de ansiedade social, transtorno obsessivo-compulsivo (TOC) e transtorno de estresse pós-traumático (TEPT). Tal como acontece com a depressão, os sintomas podem variar de leves a graves. A duração dos sintomas normalmente experimentados por pessoas com transtornos de ansiedade torna a doença mais crônica do que episódica” (World Health Organization, 2017).

Segundo a Organização Mundial da Saúde, o número total estimado de pessoas que viviam com transtornos de ansiedade no mundo, em 2015, era de 264 milhões. Isso significa um aumento de 14,9% desde 2005, como resultado do crescimento populacional e do envelhecimento. A proporção da população global com esses transtornos era estimada em 3,6%, sendo mais comum entre mulheres do que homens e sem variações substanciais entre os grupos etários. O Brasil aparece como o país com maior prevalência, 9,3% da população (World Health Organization, 2017).

A ansiedade pode ser resultado da exposição ao estresse crônico. O estresse é uma experiência comum da vida cotidiana caracterizada pela exposição a estímulos internos e externos que resultam na necessidade de adaptações comportamentais, psicológicas e fisiológicas para a manutenção de um estado de homeostase. Os mecanismos fisiopatológicos envolvidos na indução ou piora do comportamento semelhante à ansiedade com condições de estresse podem ser atribuídos ao eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (eixo HPA) e à ativação do sistema nervoso simpático, provocando a liberação de glicocorticosteróides e catecolaminas e a indução do estresse oxidativo. O estresse demonstrou ser responsável pela depleção de vários antioxidantes endógenos de eliminação de radicais livres, como glutathione peroxidase, catalase e superóxido dismutase. Uma vez que os ácidos graxos poli-insaturados são encontrados em abundância nas regiões encefálicas e uma das consequências importantes dos radicais livres oxidativos é a peroxidação de lipídios de membrana, esta reação produz danos acentuados na estrutura e função das membranas neuronais. Se supõe que essa é a principal alteração bioquímica e consequência da lesão neuronal induzida pelo oxidante, dando assim lugar ao desenvolvimento de distúrbios neurocomportamentais como a ansiedade (KUMAR; CHANANA, 2017).

Mesmo a ansiedade sendo um mecanismo de adaptação normal empregado por humanos, roedores menores e peixes para enfrentar o perigo potencial, nos seres humanos, este estado de preparação cognitiva e comportamental quando exagerado, prejudica a capacidade de responder de forma adequada ao meio ambiente gerando implicações econômicas e sociais negativas associadas (BENNEH et al., 2017).

2.2 TRATAMENTO DOS TRANSTORNOS DE ANSIEDADE

O tratamento dos diferentes tipos de transtornos de ansiedade objetiva reduzir a gravidade, a duração e a frequência dos sintomas e melhorar a função global e, a longo prazo, reduzir os sintomas ao mínimo ou a zero, melhorar a qualidade de vida e prevenir a recidiva da doença (WELLS et al., 2016).

Os tratamentos variam de acordo com o tipo de transtorno, mas basicamente seguem a mesma linha. A primeira linha de tratamento, geralmente, é composta por fármacos inibidores seletivos da recaptação de serotonina (ISRS), como a fluoxetina, sertralina e paroxetina. Na segunda ou terceira linha de tratamento, dependendo do tipo do transtorno, estão os benzodiazepínicos (BZD), como o clonazepam, e

fármacos antidepressivos de outras classes farmacológicas (Associação Brasileira de Psiquiatria, 2008). O algoritmo de tratamento é apresentado na figura 1.

Figura 1 - Algoritmo de tratamento dos transtornos de ansiedade

Transtornos	1ª linha	mg/dia	2ª linha	mg/dia	3ª linha	mg/dia
Pânico	IRSs: sertralina paroxetina IRSNs: venlafaxina	50 20 75 - 150	Tricíclicos: imipramina clomipramina	150 - 200 100 - 150	BZDs: clonazepam alprazolam	2 - 4 2 - 4
Ansiedade Social	IRS: paroxetina IRSNs: venlafaxina	40 - 60 75 - 225	BZD: clonazepam	3 - 6	RIMA: Moclobemida	750-900
Osessivo-Compulsivo	IRSs: sertralina paroxetina fluvoxamina fluoxetina clomipramina	200 60 300 60 300	Combinações IRS + antipsicótico			
Ansiedade Generalizada	IRSNs: venlafaxina IRSs: sertralina	75 - 150 50 - 200	IRSs: paroxetina	20 - 40	BZD: prazos curtos	

Fonte: Associação Brasileira de Psiquiatria. Transtornos de Ansiedade: Diagnóstico e Tratamento. P. 9, 2008. IRSs: Inibidores da Recaptação de Serotonina; IRSNs: Inibidores da Recaptação de Serotonina e Noradrenalina; BZDs: Benzodiazepínicos; RIMA: Inibidor da Monoaminoxidase A Reversível.

Os ISRS revolucionaram o tratamento da depressão em 1987, sendo a fluoxetina o primeiro fármaco lançado. Esses fármacos agem inibindo a recaptação de serotonina, o que leva ao aumento desse neurotransmissor no espaço extracelular, aumentando a ativação dos receptores serotoninérgicos e, conseqüentemente, as respostas pós-sinápticas. Esses fármacos aliviam os sintomas de uma variedade de condições psiquiátricas comuns, incluindo depressão, ansiedade e transtorno obsessivo-compulsivo (GOLAN; ARMSTRONG; ARMSTRONG, 2017).

O fato dos ISRS serem indicados como primeira linha de tratamento da ansiedade, deve-se ao fato do equilíbrio risco/benefício que apresentam. Entretanto, o início do efeito ansiolítico desses fármacos tem latência de 2 a 4 semanas e durante as primeiras 2 semanas os efeitos adversos podem ser mais fortes, o que pode reduzir a adesão ao tratamento pelos pacientes (BANDELOW; MICHAELIS; WEDEKIND, 2017).

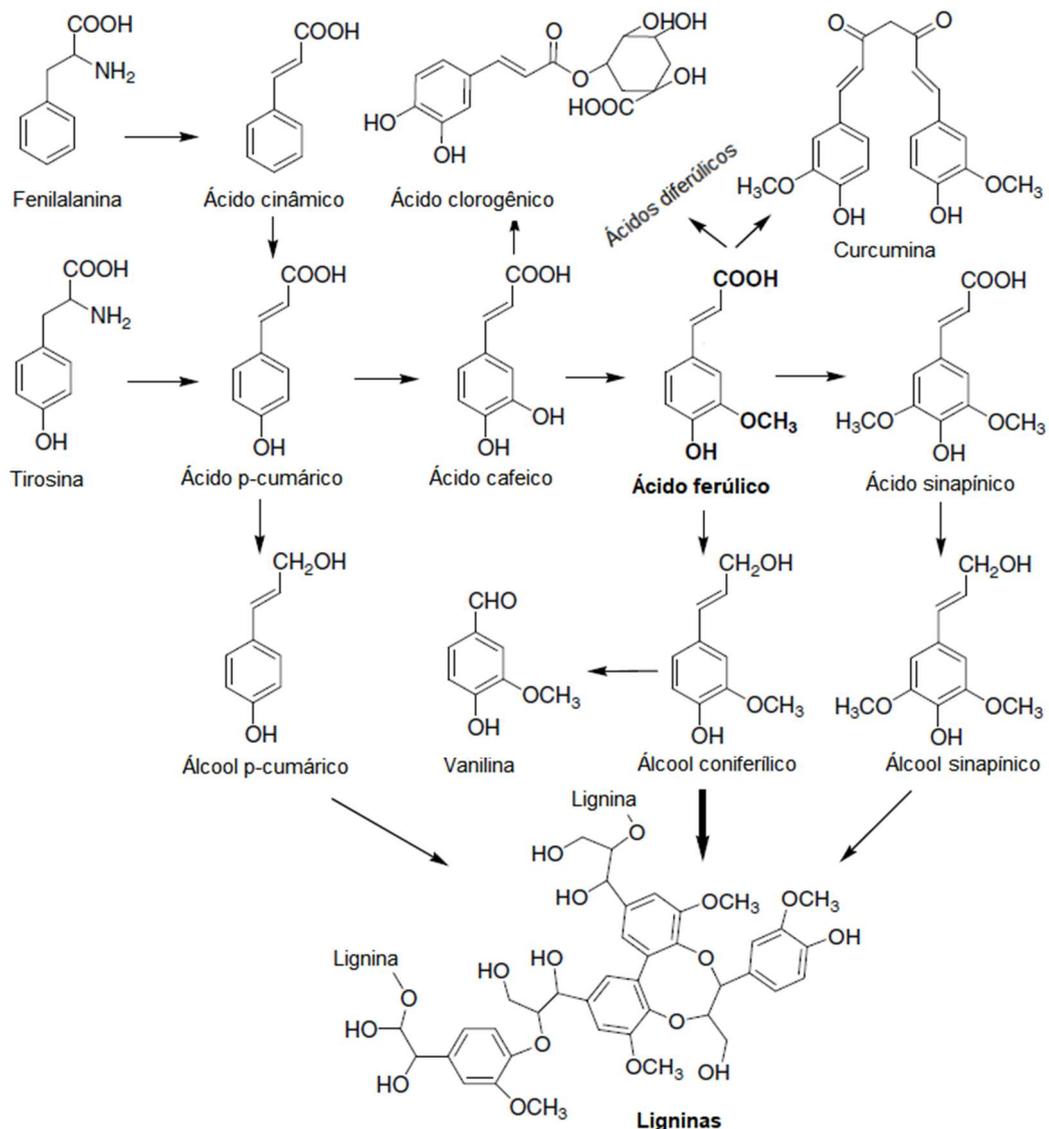
Os BZD são fármacos capazes de promover a ligação do neurotransmissor inibitório ácido γ -aminobutírico (GABA), aos receptores de GABA do subtipo GABAA. Esse receptor é um complexo proteico pentamérico, cujas subunidades são constituídas das seguintes isoformas: α (1-6), β (1-4), γ (1-3), δ , ϵ , θ , π e ρ (1-3). As cinco subunidades formam um canal íon seletivo de cloreto. A isoforma mais comum deste receptor consiste em duas subunidades α_1 , duas β_2 e uma γ_2 dispostas $\alpha_1\gamma_2\beta_2\alpha_1\beta_2$ no sentido anti-horário quando vistas a partir do espaço extracelular. Estes receptores têm dois sítios de ligação agonistas GABA e um sítio de ligação a BZD. Quando o GABA se liga ao seu sítio de ligação no receptor GABAA, ocorre abertura do canal de cloreto e, conseqüentemente, influxo de ânions cloreto, resultando em hiperpolarização do neurônio. Os BDZ são fármacos altamente seletivos que aumentam a afinidade dos receptores ao neurotransmissor GABA com conseqüente aumento da frequência de abertura dos canais e intensificação das correntes iônicas induzidas por esse neurotransmissor, resultando em depressão neuronal no sistema límbico (uma região do SNC que controla o comportamento emocional e é caracterizada pela alta densidade de receptores GABAA), atingindo dessa forma o efeito ansiolítico (BRUNTON; LAZO, PARKER, 2012; CZAPINSKI; BLASZCZYK; CZUCZWAR, 2005; GOLAN; ARMSTRONG; ARMSTRONG, 2017; WONGSAMITKUL et al., 2017)

Os efeitos ansiolíticos dos BZD começam logo após a administração oral ou parentérica. Nos Estados Unidos, 55% a 94% dos pacientes com transtornos de ansiedade são tratados com essa classe de medicamentos. Da mesma forma, estudos europeus mostraram alta taxa de uso de BZD a longo prazo. No entanto, o tratamento com esses fármacos pode estar associado à depressão do SNC resultando em fadiga, tonturas, aumento do tempo de reação, habilidade de condução prejudicada entre outros efeitos adversos. As funções cognitivas de pacientes em uso de BZD podem ser prejudicadas, principalmente em pacientes idosos. O tratamento prolongado pode levar a dependência especialmente em pacientes predispostos ao abuso de substâncias. Assim, os riscos e benefícios devem ser cuidadosamente considerados antes de iniciar o tratamento com BZD. As diretrizes atuais não recomendam esses fármacos como tratamentos de primeira linha baseados nos riscos conhecidos e não em estudos de comparação direta com antidepressivos como os ISRS (BANDELOW; MICHAELIS; WEDEKIND, 2017).

2.3 ÁCIDO FERÚLICO

O AF é um dos metabólitos da biossíntese da lignina a partir da fenilalanina e tirosina em plantas (Figura 2). Encontra-se em tecidos vegetais em duas formas: livre e conjugado; a soma destas duas formas indica a concentração total. O AF foi isolado pela primeira vez de uma resina comercial da planta *Ferula foetida* em 1866, sintetizado quimicamente em 1925 e seus efeitos biológicos começaram a ser notados na década de 1970, quando pesquisadores japoneses descobriram as propriedades antioxidantes dos ésteres de AF extraídos do óleo de arroz (GRAF, 1992; ZHAO; MOGHADASIAN, 2008).

Figura 2 - Estrutura química e síntese do ácido ferúlico e compostos relacionados em plantas



Fonte: Adaptado de ZHAO; MOGHADASIAN, 2008

O AF é um constituinte fenólico presente em muitos grãos (arroz, trigo, cevada, aveia), frutas (cítricas, banana) e vegetais (beringela, broto de bambu, repolho, espinafre, brócolis) que mostrou uma vasta gama de propriedades farmacológicas incluindo efeitos contra a inflamação (ZHAO et al., 2014), estresse oxidativo (KUMAR; PRUTHI, 2014), câncer (LI et al., 2012), diabetes (AZAY-MILHAU et al., 2013), trombose (HONG et al., 2016), envelhecimento (HAHN et al., 2016) e neurotoxicidade induzida por glutamato (JIN et al., 2007) ou β -amilóide (YAN et al., 2001). Além disso, foram documentados efeitos neuroprotetores em modelos animais de isquemia cerebral focal, doença de Alzheimer, lesão da medula espinhal e acidente vascular cerebral (HASSANZADEH et al., 2016). No Japão, ele é utilizado como antioxidante e conservante alimentar. Já na China, seu uso é destinado para o tratamento de doenças cardiovasculares e cerebrovasculares (ZHAO; MOGHADASIAN, 2008).

O AF apresenta isomeria *cis-trans*, sendo a *trans* a forma mais comumente encontrada na natureza. O ácido *cis*-ferúlico se apresenta como um óleo amarelado enquanto a forma *trans* tem formato de cristais. A obtenção do AF para uso na indústria pode ser através da extração de fontes naturais por hidrólise ou ação enzimática de micro-organismos; ou de forma sintética através da reação de condensação da vanilina com o ácido malônico, catalisada por aminas terciárias (GRAF, 1992).

2.3.1 Farmacocinética do ácido ferúlico

Após uma incubação com AF livre por 25 minutos no estômago do rato, mais de 70% da quantidade administrada é absorvida pelo estômago e é recuperado na mucosa gástrica, sangue, bile e urina, sugerindo uma alta taxa de absorção gástrica. Depois desse tempo, o AF conjugado ou derivado não é detectado no conteúdo ou mucosa gástrica, isso indica que o AF pode ser absorvido em sua forma livre no estômago de rato e suas células epiteliais não o metabolizam. Da mesma forma, o AF administrado oralmente é rapidamente recuperado no plasma do rato e em alta concentração. O AF apresenta distribuição tecidual elevada, sendo encontrado em sua forma livre nos rins, fígado, baço, coração, útero e cérebro, 30 minutos após sua absorção. A principal via de metabolismo do AF é através de reação de conjugação com ácido glicurônico e/ou sulfato. Isso acontece principalmente no fígado através

das atividades de sulfotransferases e UDP (uridina 5'-difosfo)-glucuronosiltransferases, mas a mucosa intestinal e o rim também podem contribuir para este processo. A conjugação do AF pode ser dependente da dose, ou seja, doses muito altas de AF saturam as enzimas de conjugação e isso leva ao acúmulo de AF livre no plasma (POQUET; CLIFFORD; WILLIAMSON, 2008; ZHAO; EGASHIRA; SANADA, 2003, 2004; ZHAO; MOGHADASIAN, 2008).

Segundo Tu et al. (2012), o AF pode atravessar a barreira hematoencefálica e atingir o cérebro. Pode ser absorvido completamente, metabolizado rapidamente e excretado pelos rins sem acumulação aparente *in vivo*. Pode atenuar a morte das células neuronais causada pela absorção de lipoproteínas de baixa densidade oxidadas, radicais hidroxila e peroxila *in vitro*.

Tanto o AF quanto seus metabólitos são excretados principalmente pelo rim. Em ratos a excreção urinária é rápida e atinge o platô 1,5 hora após a administração, já em humanos o platô ocorre entre 7 e 9 horas após o consumo. A excreção urinária é influenciada pela conjugação ou não do AF, sendo o conjugado mais lento que o puro. O tempo de meia-vida é muito curto (aproximadamente 15 minutos), indicando baixa toxicidade (MANCUSO; SANTANGELO, 2014).

2.3.2 Ácido ferúlico e efeitos comportamentais

Segundo Zhao e Moghadasian (2008), o AF tem a propriedade antioxidante como sua atividade biológica melhor documentada. Essa atividade pode ser explicada por sua estrutura química (Figura 2): (1) a presença de hidrogênio lábil pertencente ao grupo fenólico, formando um sistema conjugado que envolve o anel aromático, a dupla ligação e a carbonila do ácido caboxílico, conduz a formação de produtos estáveis de menor energia; (2) a presença da insaturação na cadeia lateral proporciona sítios para o ataque por radicais livres; (3) o grupo ácido carboxílico pode permitir uma interação com a bicamada lipídica da membrana celular que fornece proteção contra a peroxidação lipídica (NADAL, 2016).

Baseado em estudos que afirmam que o estresse oxidativo pode levar à morte neuronal e, conseqüentemente, a doenças neurológicas, pesquisadores tem investigado os efeitos do ácido ferúlico sobre o comportamento em modelos animais. Em dois estudos realizados, em 2014, em nosso laboratório, foi investigada a possível ação ansiolítica do AF em ratos *Wistar* machos. O fármaco foi administrado por

gavagem, quinze minutos antes da realização do teste do labirinto em cruz elevado. Como resultado, o AF 100 mg/L aumentou o tempo de permanência dos animais no braço aberto comparados ao grupo não tratado ou tratado com dose menor, demonstrando uma sutil atividade ansiolítica (ROMANOWSKI, 2014; RIPKA; SANTOS, 2014).

Zeni et al. (2012) investigaram o efeito tipo antidepressivo do AF, administrando doses de 0.001–10 mg/kg via oral, 60 minutos antes da realização dos testes: natação forçada, suspensão pela cauda e campo aberto. As doses de 0,01, 0,1, 1 ou 10 mg/Kg diminuiriam significativamente o tempo de imobilidade no teste de natação forçada e suspensão pela cauda quando comparado ao controle, indicando efeito tipo antidepressivo. As mesmas doses não produziram efeito no teste de campo aberto, indicando que não há comprometimento locomotor. Nesse mesmo estudo, foi investigado se o AF seria capaz de potencializar o efeito dos antidepressivos ISRS: fluoxetina, paroxetina e sertralina. O resultado mostrou que o AF potencializa o efeito antidepressivo sem afetar a capacidade locomotora.

Outro estudo realizado por Zeni; Camargo e Dalmagro (2017), assim como os realizados por Chen et al. (2015), Li et al. (2015) e Liu et al. (2017) também demonstraram que o AF apresenta efeito tipo antidepressivo em ratos.

A relação direta do AF e ansiedade no modelo animal *zebrafish* ainda não tem estudos publicados.

2.4 ZEBRAFISH COMO MODELO DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL

O peixe *Danio rerio*, popularmente conhecido como *zebrafish* ou paulistinha (figura 3), é um animal ovíparo (fertilização e desenvolvimento externo), que mede entre 2 e 5 cm na fase adulta e vive cerca de 2 anos. O baixo custo de habitação, a facilidade de manuseio e administração de fármaco, a taxa de reprodução elevada e a homologia de genes com mamíferos o torna modelo adequado para o estudo de doenças humanas. É fato bem estabelecido que ele também exibe várias respostas neurobiológicas. Como outros vertebrados, o *zebrafish* exibe respostas cognitivas, sensorimotor e respostas motoras básicas que são controladas pelo sistema nervoso central. Assim, são ótimos candidatos para estudos neuroquímicos e comportamentais. Além disso, pode-se fazer estudos utilizando suas larvas e embriões (MAKHIJA; JAGTAP, 2014; VIANNA, 2012). A sensibilidade deste peixe a

todos os principais fármacos neurotrópicos e a capacidade de responder a eles de forma semelhante aos seres humanos suportam a sua utilidade para a investigação farmacológica (KALUEFF; STEWART; GERLAI, 2014).

Figura 3 - Peixe *Danio rerio*



Fonte: Zebrafish Disease Models Society. Zebrafish and Human Disease.

O uso de *zebrafish* na pesquisa científica apresenta várias vantagens em relação à outras espécies de vertebrados, como o seu tamanho reduzido – que reduz consideravelmente o espaço de habitação, custo de criação e torna reduzidas as quantidades das substâncias a serem testadas e dosadas; a fácil manutenção dos animais em laboratório, a reprodução rápida e a morfologia desenvolvida de maneira rápida (HILL et al., 2005).

A pesquisa com *zebrafish* já tem contribuições substanciais e promete aumentar a compreensão dos papéis detalhados de genes específicos em doenças humanas. Os experimentos com esses animais estão fornecendo verificação independente da atividade de um gene implicado em uma doença humana. Os teleósteos (infra-classe *Teleostei* – uma das três da classe *Actinopterygii*, a qual pertence esse peixe) sofreram uma rodada adicional de duplicação de todo o genoma. Eles têm um maior número de genes espécie-específicos em seu genoma do que o humano, rato ou frango. Alguns desses números aumentados de genes são consequência dessa duplicação adicional. Comparando o genoma humano com o do *zebrafish*, 71,4% dos genes humanos possuem pelo menos um ortólogo no *zebrafish* e, reciprocamente, 69% dos genes do *zebrafish* possuem pelo menos um ortólogo humano. Assim, o *zebrafish* tem sido usado com sucesso para entender a atividade biológica de genes ortólogos a genes relacionados a doenças humanas em maior detalhe (HOWE et al., 2013).

Já foram identificados nesta espécie os sistemas de neurotransmissão: purinérgico, gabaérgico, glutamatérgico, colinérgico, dopaminérgico, serotoninérgico e histaminérgico (SANT'ANNA, 2009).

Tendo a complexidade do sistema, com a sequência de nucleotídeos de seus genes apresentando mais de 70% de homologia com humanos, junto a simplicidade prática, essa espécie vem aumentando a sua popularidade no meio científico. Além da similaridade genética, apresenta características evolutivamente conservadas em muitos níveis de sua organização biológica, como o layout neuroanatômico básico do cérebro semelhante ao de outras espécies de vertebrados e seus sistemas de neurotransmissores semelhante aos dos mamíferos. Dessa forma, muitos fármacos desenvolvidos para aplicações clínicas humanas ou para outros mamíferos, mostram-se eficazes no *zebrafish* atuando através de receptores e mecanismos bioquímicos semelhantes, comparados aos mamíferos. Embora existam muitas semelhanças entre o *zebrafish* e as espécies de mamíferos, uma vez que o *zebrafish* é evolutivamente mais antigo, seu cérebro é substancialmente menos complexo do que o cérebro de mamífero. Sendo assim, o *zebrafish* é uma excelente ferramenta de triagem de drogas (SHAMS et al., 2017).

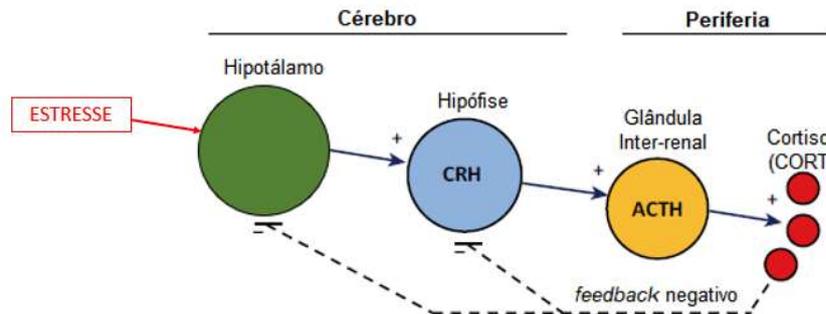
2.4.1 *Zebrafish* e ansiedade

Já foram propostas várias análises de medo e ansiedade para o *zebrafish*. O medo, resposta a uma ameaça iminente, foi estudado nessa espécie através de suas reações ao ser exposto a predadores ou ao feromônio de alarme, que se mostraram como fuga, movimentos erráticos, “comportamento de congelamento”, habitação no fundo do aquário e aglomeração para formar um cardume denso. Já a ansiedade, resposta a ameaças futuras ou possíveis, é manifestada com comportamento de evasão. Além disso, o *zebrafish* tem preferência por ambiente escuro e aversão a ambientes de luz, e este é um parâmetro comportamental útil no estudo da ansiedade. Ao serem tratados com fluoxetina, clonazepam e buspirona, a aversão a luz é reduzida nesses animais (GEBAUER et al., 2011).

A figura 4 ilustra o sistema de estresse neuroendócrino (hipotálamo-hipófise-inter-renal, HPI), que libera cortisol da glândula inter-renal (semelhante à glândula adrenal em mamíferos) em resposta ao hormônio adrenocorticotrópico (ACTH) após a liberação de corticotropina (CRH) pelo hipotálamo provocada pelo estresse. O cortisol liberado para a circulação sanguínea ativa os receptores de glicocorticoides para inibir a liberação de CRH e ACTH (*feedback* negativo) de forma a proteger o peixe da sobre ativação patológica do eixo HPI. Assim como os seres humanos, o

zebrafish tem o cortisol como seu principal hormônio do estresse, ao contrário dos roedores que usam a corticosterona (STEWART et al., 2014).

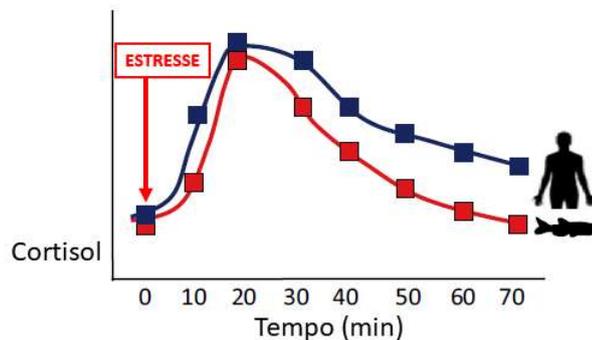
Figura 4 - Sistema de estresse neuroendócrino do *zebrafish*



Fonte: Adaptado de: Stewart ,A. D.,et al. Zebrafish models for translational neuroscience research: from tank to bedside. **Trends in Neurosciences**, v. 37, n. 5, p. 264–278, 2014.

Outra semelhança com os humanos é a dinâmica de tempo da liberação rápida e robusta do cortisol em resposta ao estresse (figura 5). As situações que provocam fortes respostas comportamentais e fisiológicas no *zebrafish* são a exposição aguda aos seus predadores naturais, exposição a feromonas de alarme, estresse agudo de restrição, estresse de novidade, confrontações sociais, retirada de medicamentos ou tratamentos farmacológicos com vários agentes ansiogênicos (STEWART et al., 2014).

Figura 5 - Dinâmica de tempo de respostas típicas do cortisol ao estresse agudo em humanos e *zebrafish*



Fonte: Adaptado de: Stewart ,A. D.,et al. Zebrafish models for translational neuroscience research: from tank to bedside. **Trends in Neurosciences**, v. 37, n. 5, p. 264–278, 2014.

Sabendo que os transtornos de ansiedade tendem a atingir cada vez mais pessoas no mundo e que os fármacos hoje utilizados apresentam diversos efeitos colaterais ou não são eficazes a todos os pacientes, a pesquisa de novos fármacos

para o tratamento dessa patologia torna-se importante. As substâncias extraídas de plantas representam uma boa oportunidade de descobrir novos fármacos. O AF tem sua atividade antidepressiva descrita em diversos estudos já publicados, além disso, possui características farmacocinéticas interessantes. Além disso, esses transtornos têm como primeira linha de tratamento fármacos que são utilizados no transtorno depressivo assim, o AF é um bom candidato para ter a ação ansiolítica avaliada.

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

Avaliar a atividade ansiolítica do ácido ferúlico em modelo animal utilizando *zebrafish* (*Danio rerio*).

3.2 ESPECÍFICOS

- Avaliar se o ácido ferúlico apresenta atividade ansiolítica no teste claro/escuro;
- Avaliar o possível mecanismo de ação do ácido ferúlico, utilizando o antagonista de benzodiazepínico flumazenil.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ASPECTOS ÉTICOS

Essa pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da UEPG. Processo CEUA: 029/2017.

4.2 ANIMAIS

Os animais utilizados foram peixes *zebrafish* adultos (4 a 6 meses, proporção de 50-50% de macho:fêmea) comprados de uma loja comercial especializada em peixes ornamentais (Peixe.com Aquarismo) na cidade de Ponta Grossa/PR. Os animais foram mantidos em aquários de 100L (100 peixes/aquário) por no mínimo 1 semana para se ambientarem. Todos os tanques eram preenchidos com água sem cloro (previamente tratado com 132 $\mu\text{L.L}^{-1}$ de AquaSafe®), mantidos sob filtração mecânica e química, em temperatura de $26\pm 2^\circ\text{C}$ e pH entre 7,0 e 8,0. Os tanques eram iluminados por lâmpadas fluorescentes com um ciclo de 14/10h claro/escuro (luz acesa às 7:00h). Os animais eram alimentados com uma ração comercial para peixes (Alcon BASIC®, Alcon, Brasil). Todos os animais usados neste estudo eram “naive”, saudáveis e livres de sinais de doenças. Foram mantidos de acordo com o *National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals* (2011).

4.3 TRATAMENTO

4.3.1 Fármacos

- *Ácido trans-ferúlico (cristal)*: Pharmanostra®.
- *Clonazepam*: Rivotril® 2,5 mg/mL (laboratório Roche).
- *Flumazenil*: Flunexil® (solução injetável 0,5 mg/5 mL - do laboratório BioChimico).
- *Fluoxetina (cristal)*: Viafarma®

4.3.2 Teste de atividade ansiolítica

Para analisar se o AF apresenta atividade ansiolítica os peixes foram divididos nos seguintes grupos (n=14 por grupo): 1) controle negativo (solução de etanol 5,2 mg/L); 2) clonazepam 0,75 mg/L (baseado em Gebauer et al. (2011) e experimento piloto para determinação dessa concentração); 3) fluoxetina 10 mg/L (baseado em Benneh et al. (2017)); 4) AF 100 mg/L; 5) AF 250 mg/L e 6) AF 500 mg/L. As concentrações de AF foram determinadas através de experimentos pilotos. Era preparada 300 mL de solução no qual o peixe permanecia, individualmente, por 10 minutos (baseado em Gebauer et al. (2011)) antes de ser colocado no aquário teste. A água utilizada para o preparo das soluções era do aquário moradia.

Como o AF é fotossensível, o recipiente da solução de tratamento foi recoberto com papel alumínio. Da mesma forma, os recipientes com as soluções controles eram recobertos para que o estresse causado nos animais fosse semelhante.

O controle negativo foi feito com etanol porque o AF é insolúvel em água. Para preparar as soluções com o AF, ele era solubilizado em uma quantidade de etanol (0,2 g para 2900 µL de álcool etílico absoluto) e a partir dessa solução eram feitas as soluções nas concentrações de 100, 250 e 500 mg/L através da diluição em água. A solução em etanol era preparada diariamente para diluição imediata e realização do teste.

Em experimento piloto, foi realizado o teste com peixes tratados com o controle negativo etanol e comparado com peixes tratados com água pura. Os resultados não diferiram entre os grupos. Por isso, foi escolhida a solução de etanol como controle.

4.3.3 Envolvimento do sistema gabaérgico no mecanismo de ação do AF

Esse experimento foi realizado em três fases:

- *Fase 1:* determinação da concentração efetiva de flumazenil no bloqueio do clonazepam 0,75 mg/L (controle positivo).

Os peixes foram divididos nos seguintes grupos (n=14 por grupo): 1) controle negativo (solução de etanol 5,2 mg/L); 2) clonazepam 0,75 mg/L; 3) flumazenil 1 mg/L e clonazepam 0,75 mg/L; 4) flumazenil 1,25 mg/L e clonazepam 0,75 mg/L. Os animais dos grupos 3 e 4 eram pré-tratados, individualmente, por 20 minutos com flumazenil e depois colocados por 10 minutos na solução de clonazepam. Os animais dos grupos 1 e 2 receberam tratamento de 10 minutos. As concentrações de flumazenil e tempo de pré-tratamento foram baseados no estudo de Benneh et al. (2017).

Após o tratamento, os animais eram colocados no aquário teste claro/escuro.

- *Fase 2:* verificação da especificidade do efeito do flumazenil em bloquear os efeitos de fármacos que atuam no sítio de ligação de benzodiazepínico no receptor GABA_A.

Os peixes foram divididos nos grupos (n=14 por grupo): 1) controle negativo (solução de etanol 5,2 mg/L); 2) fluoxetina 10 mg/L e 3) flumazenil 1,25 mg/L + fluoxetina 10 mg/L. Os animais do grupo 3 foram pré-tratados, individualmente, por 20 minutos com flumazenil e depois expostos à solução de fluoxetina 10 mg/L. Os animais dos grupos 1 e 2 receberam tratamento de 10 minutos.

Após o tratamento, os animais foram colocados no aquário teste claro/escuro.

- *Fase 3:* verificação da relação do sistema gabaérgico na ação do AF.

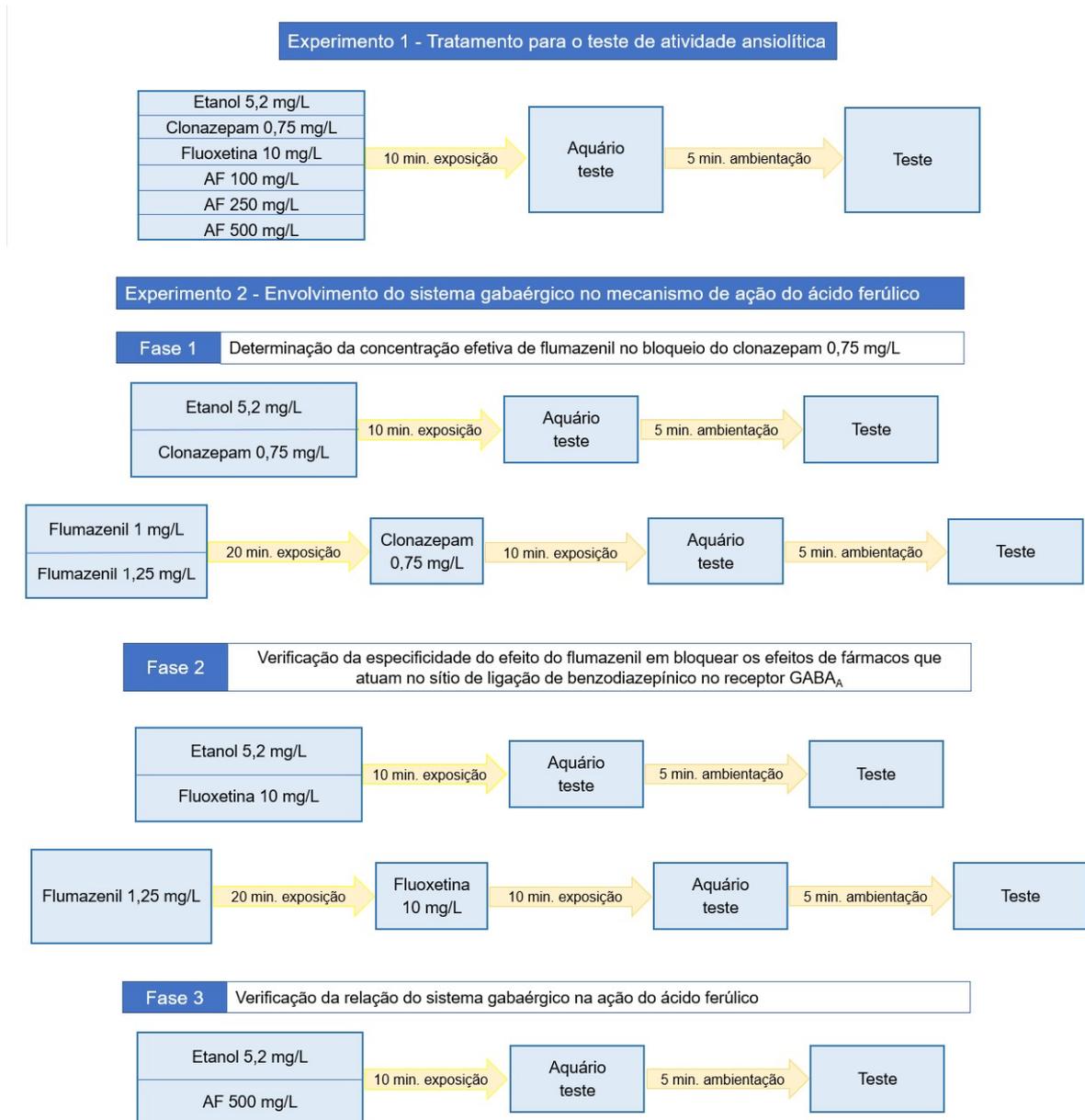
Determinada a concentração efetiva de flumazenil, o fármaco foi associado ao tratamento com AF. Os peixes foram divididos nos grupos (n=14 por grupo): 1) controle negativo (solução de etanol 5,2 mg/L); 2) AF 500 mg/L e 3) flumazenil 1,25 mg/L + AF 500 mg/L. Os animais do grupo 3 foram pré-tratados, individualmente, por 20 minutos com flumazenil e depois expostos à solução de AF 500 mg/L. Os animais dos grupos 1 e 2 receberam tratamento de 10 minutos.

Após o tratamento, os animais foram colocados no aquário teste claro/escuro.

Todas as etapas experimentais realizadas estão resumidas no fluxograma da figura 6.

O N amostral por grupo foi baseado no estudo publicado por Gebauer et al. (2011), definido pelo programa GPower 3.1, para um erro alfa de 0,05, poder de 0,80 e tamanho de efeito de 1,105252.

Figura 6 - Fluxograma dos experimentos



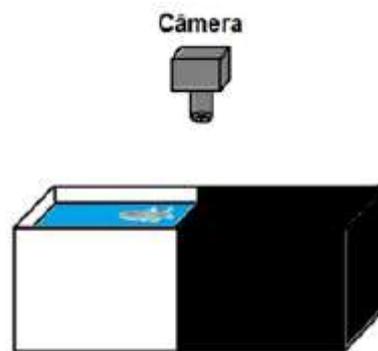
Fonte: A autora

4.4 TESTE CLARO/ESCURO

Realizado em um aquário (18 x 9 x 7 cm), dividido em 2 partes iguais (ilustrado na figura 7) sendo uma com o fundo e as laterais de cor preta e com

tampa da mesma cor (lado escuro) e outra com fundo e laterais de cor branca e sem tampa, permitindo entrada da luz (lado claro). Entre essas duas partes há uma comporta corrediça de cor preta que pode ser levantada do fundo do aquário. No teste, o peixe é colocado nesse aquário, no compartimento claro, preenchido com água do aquário moradia, sem drogas, até uma altura de 3 cm e deixado nesse ambiente por 5 minutos. Após esse tempo, a comporta é aberta deixando um espaço de 1 cm na parte inferior do aquário, permitindo sua passagem para o lado escuro. Como este aquário é bastante raso, restringe a habitação inferior, que é um comportamento de ansiedade bem estabelecido em um novo ambiente. Desta forma, a estratégia de proteção é a preferência pelo ambiente escuro, que é a medida usada nesse teste. Ao abrir a comporta e permitir a passagem do peixe para a aérea escura, foram registradas através de filmagem durante 5 minutos: 1) a latência para a primeira entrada no compartimento escuro; 2) o tempo gasto no compartimento claro; e 3) o número de cruzamentos entre os compartimentos (CAMPOS, 2016; GEBAUER et al., 2011).

Figura 7 - Aparato experimental para execução do teste claro-escuro em *zebrafish*



Fonte: Adaptado de: CAMPOS, E. G. "Zebrafish como organismo-modelo para análises de efeitos comportamentais e toxicológicas da cetamina empregando cromatografia em fase gasosa e estatística multivariada". 2016, 72 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos no teste de claro/escuro foram analisados pelo teste de normalidade de D'Agostino & Pearson. Os dados sem distribuição normal foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste post-hoc de

comparação múltipla de Dunn. Em todas as análises, o nível de significância foi de $p < 0,05$.

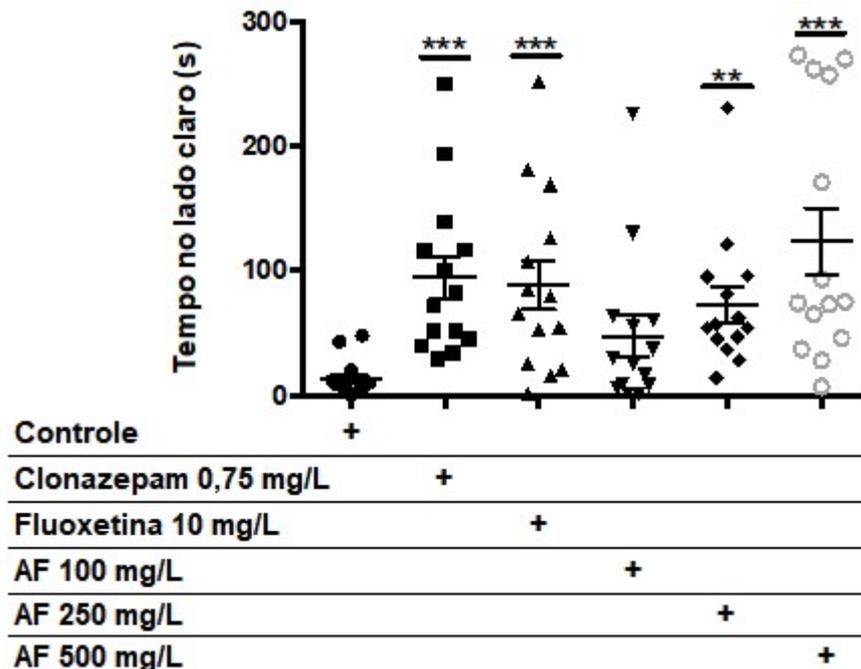
O programa estatístico utilizado para realizar as análises foi o GraphPad Prism 6.

5 RESULTADOS

5.1 TESTE DE ATIVIDADE ANSIOLÍTICA

As médias (em segundos) e desvios-padrões obtidos de cada grupo no parâmetro “tempo de permanência no ambiente claro” foram: 1) controle negativo: $13 \pm 14,63$; 2) clonazepam 0,75 mg/L: $94,43 \pm 64,87$; 3) fluoxetina 10 mg/L: $88,5 \pm 72,25$; 4) AF 100 mg/L: $47,5 \pm 62,17$; 5) AF 250 mg/L: $73 \pm 53,86$; e 6) AF 500 mg/L: $123,6 \pm 100,4$. Para avaliar se houve diferença estatística entre os grupos tratados e o grupo controle foi utilizada a comparação das médias através do teste estatístico de Kruskal-Wallis (resultado: $p \leq 0,0001$) seguido pelo teste post-hoc de Dunn. Houve diferença estatística nos grupos: clonazepam 0,75 mg/L ($p \leq 0,001$), fluoxetina 10 mg/L ($p \leq 0,001$), AF 250 mg/L ($p \leq 0,01$) e AF 500 mg/L ($p \leq 0,001$), quando comparados com o grupo controle. Esses dados estão representados no gráfico 1.

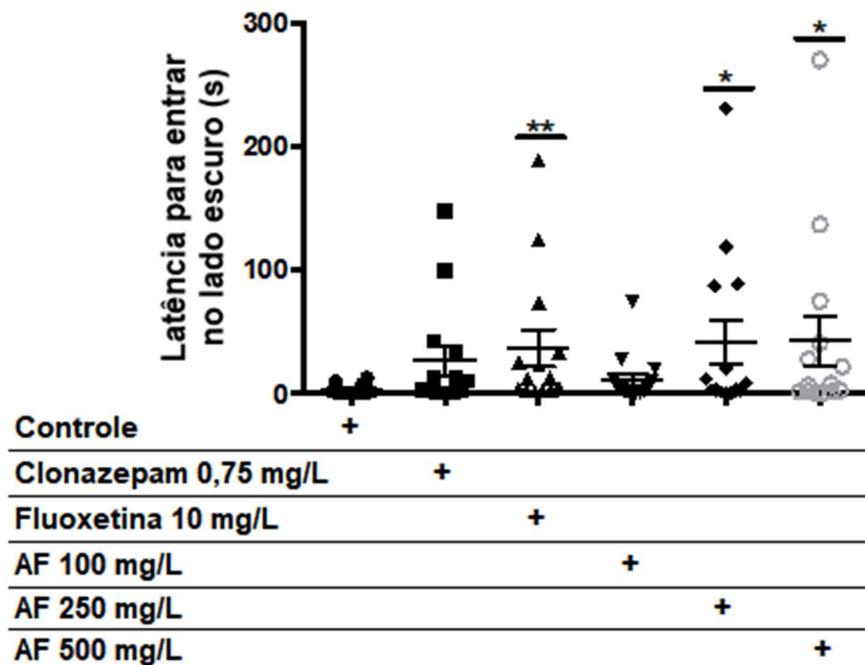
Gráfico 1 - Tempo de permanência no ambiente claro



Fonte: A autora. Cada ponto no gráfico indica o valor de um animal. (s): segundos; **: $p \leq 0,01$, comparado ao grupo controle; ***: $p \leq 0,001$, comparado ao grupo controle, calculado pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste posthoc de Dunn.

O segundo parâmetro avaliado no mesmo teste foi a “latência para a primeira entrada no compartimento escuro”. As médias (em segundos) e desvios-padrões foram: 1) controle negativo: $3,214 \pm 4,003$; 2) clonazepam 0,75 mg/L: $26,64 \pm 44,23$; 3) fluoxetina 10 mg/L: $36,86 \pm 55,85$; 4) AF 100 mg/L: $11,71 \pm 19,72$; 5) AF 250 mg/L: $41,71 \pm 67,57$; e 6) AF 500 mg/L: $42,79 \pm 75,83$. Na avaliação deste parâmetro houve diferença entre os grupos ($p \leq 0,001$, Kruskal-Wallis). No teste post-hoc de Dunn observamos as seguintes diferenças: fluoxetina ($p \leq 0,01$), AF 250 mg/L ($p \leq 0,05$) e AF 500 mg/L ($p \leq 0,05$), todos em comparação com o grupo controle. Esses resultados são apresentados no gráfico 2.

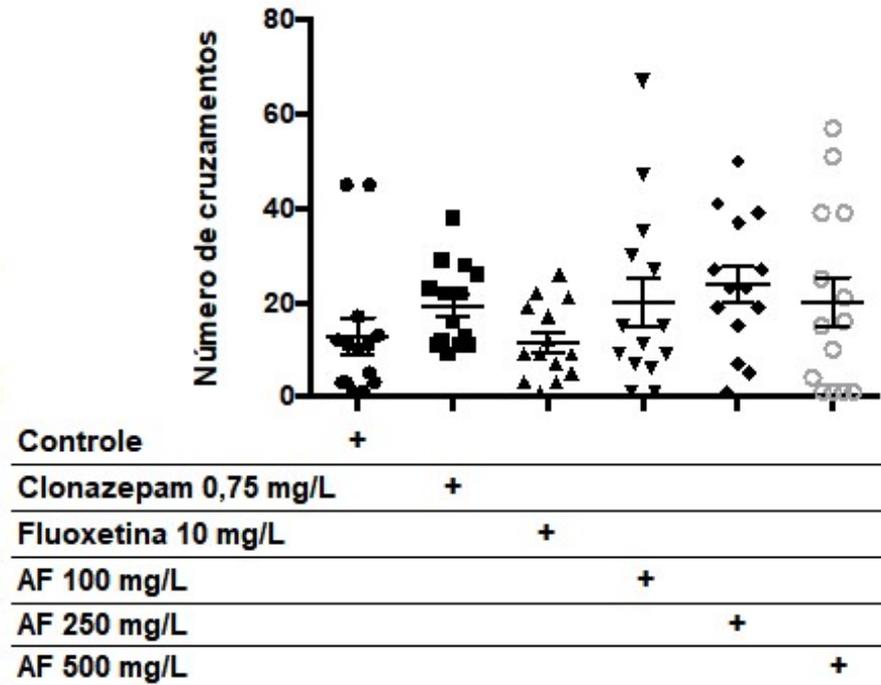
Gráfico 2 - Latência para a primeira entrada no compartimento escuro



Fonte: A autora. Cada ponto no gráfico indica o valor de um animal. (s): segundos; *: $p \leq 0,05$, comparado ao grupo controle; **: $p \leq 0,01$, comparado ao grupo controle.

O terceiro, e último, parâmetro analisado foi o “número de cruzamentos entre os compartimentos claro e escuro”. As médias dos números de cruzamentos de cada grupo e seus desvios-padrões foram: 1) controle: $12,86 \pm 14,5$; 2) clonazepam 0,75 mg/L: $19,36 \pm 8,811$; 3) fluoxetina 10 mg/L: $11,64 \pm 8,006$; 4) AF 100 mg/L: $20 \pm 19,16$; 5) AF 250 mg/L: $23,79 \pm 14,38$ e AF 500 mg/L: $20,07 \pm 19,45$. Nesse parâmetro, utilizando a comparação das médias através do teste estatístico de Kruskal-Wallis, não houve diferença entre os grupos tratados com os fármacos em relação ao grupo controle, considerando $p < 0,05$. Esses resultados estão no gráfico 3.

Gráfico 3 - Número de cruzamentos entre os compartimentos claro e escuro



Fonte: A autora. Cada ponto no gráfico indica o valor de um animal.

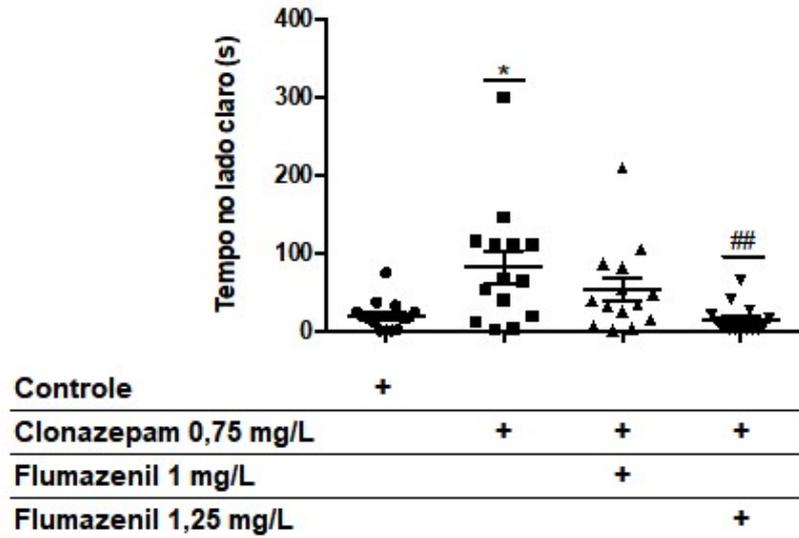
5.2 ENVOLVIMENTO DO SISTEMA GABAÉRGICO NO MECANISMO DE AÇÃO DO AF

- *Fase 1*: determinação da concentração efetiva de flumazenil no bloqueio do clonazepam 0,75 mg/L (controle positivo).

Os resultados obtidos nessa fase foram (média \pm desvio padrão):

Tempo de permanência no compartimento claro: 1) controle: $20 \pm 19,64$; 2) clonazepam 0,75 mg/L: $82,87 \pm 78,29$; 3) flumazenil 1 mg/L e clonazepam 0,75 mg/L: $53,29 \pm 55,09$; 4) flumazenil 1,25 mg/L e clonazepam 0,75 mg/L: $14 \pm 19,14$. Para avaliar se houve diferença estatística entre os grupos foi utilizada a comparação das médias através do teste estatístico de Kruskal-Wallis, que resultou em $p \leq 0,001$, seguido pelo teste post-hoc de Dunn, que mostrou as diferenças entres os grupos: controle x clonazepam 0,75 mg/L ($p \leq 0,05$) e clonazepam 0,75 mg/L x flumazenil 1,25 mg/L e clonazepam 0,75 mg/L ($p \leq 0,01$). Gráfico 4.

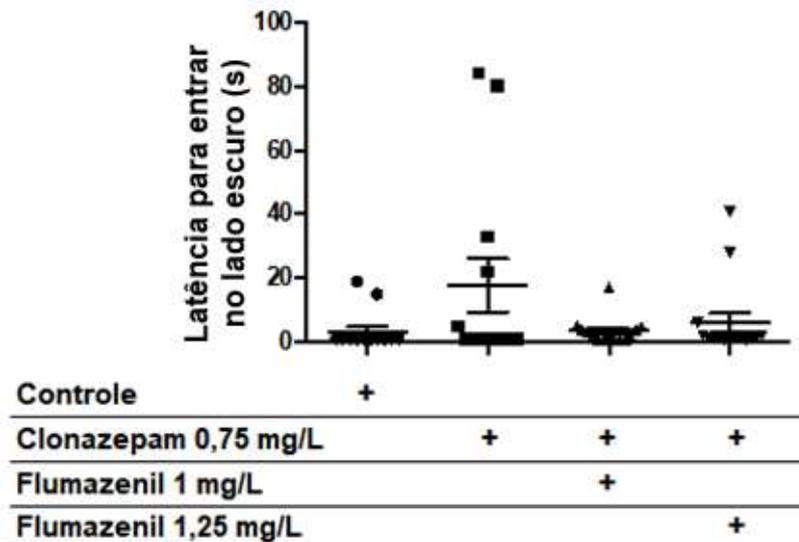
Gráfico 4 - Tempo de permanência no lado claro após tratamento com clonazepam e/ou flumazenil seguido de clonazepam



Fonte: A autora. Cada ponto no gráfico indica o valor de um animal. *: $p \leq 0,05$, comparado ao grupo controle); ##: $p \leq 0,01$, comparado ao grupo clonazepam 0,75 mg/L.

Latência para primeira entrada no compartimento escuro: 1) controle negativo: $3,357 \pm 5,839$; 2) clonazepam 0,75 mg/L: $17,85 \pm 30,17$; 3) flumazenil 1 mg/L e clonazepam 0,75 mg/L: $3,429 \pm 4,201$; 4) flumazenil 1,25 mg/L e clonazepam 0,75 mg/L: $6 \pm 11,9$. Considerando $p \leq 0,05$, não houve diferença estatística entre os grupos segundo o teste de Kruskal-Wallis realizado com as médias. Gráfico 5.

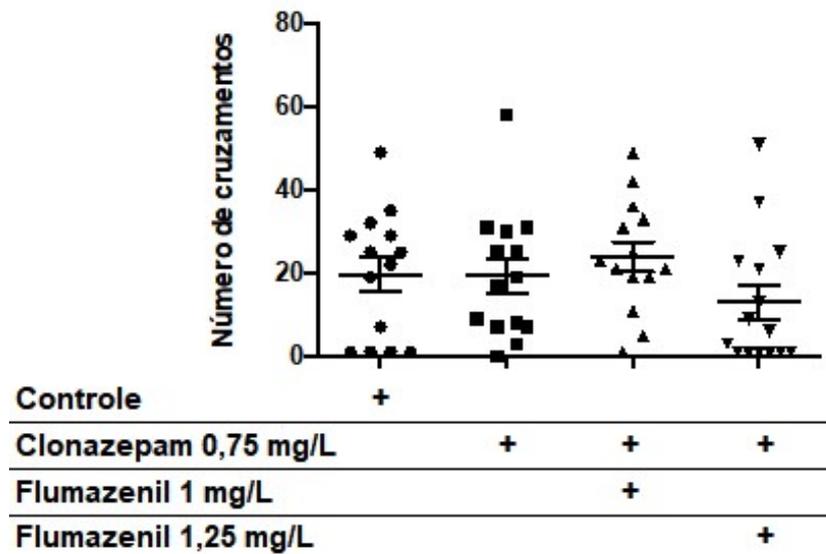
Gráfico 5 - Latência para primeira entrada no compartimento escuro após tratamento com clonazepam e/ou flumazenil seguido de clonazepam



Fonte: A autora. Cada ponto no gráfico indica o valor de um animal.

Número de cruzamentos entre os compartimentos claro e escuro: 1) controle negativo: $19,71 \pm 15,29$; 2) clonazepam 0,75 mg/L: $19,19 \pm 15,52$; 3) flumazenil 1 mg/L e clonazepam 0,75 mg/L: $24 \pm 13,45$; 4) flumazenil 1,25 mg/L e clonazepam 0,75 mg/L: $12,93 \pm 15,48$. Realizado o teste de Kruskal-Wallis com as médias, não houve diferença estatística entre os grupos, considerando $p < 0,05$. Gráfico 6.

Gráfico 6 - Número de cruzamentos entre os compartimentos após tratamento com clonazepam e/ou flumazenil seguido de clonazepam



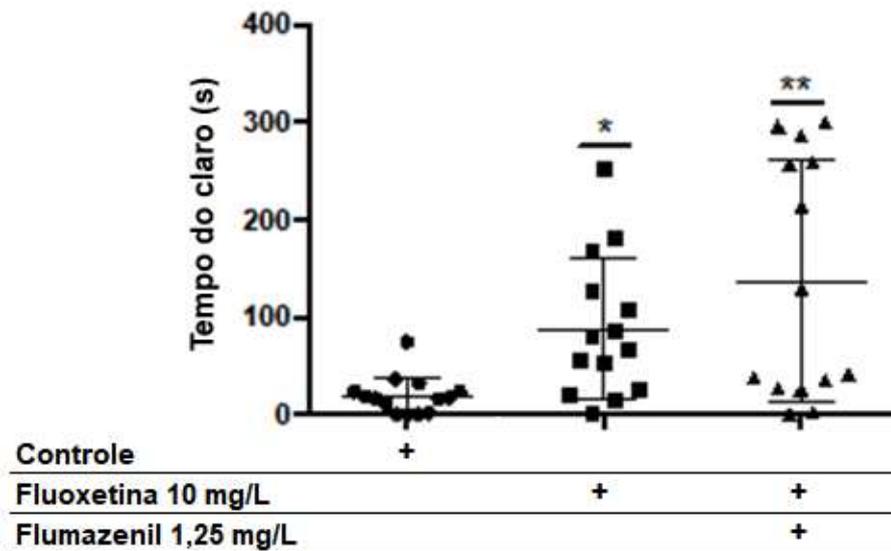
Fonte: A autora. Cada ponto no gráfico indica o valor de um animal.

- *Fase 2:* verificação da especificidade do efeito do flumazenil em bloquear os efeitos de fármacos que atuam no sítio de ligação de benzodiazepínico no receptor GABA_A.

Os resultados obtidos nessa fase foram (média \pm desvio padrão):

Tempo de permanência no compartimento claro: 1) controle negativo: $20 \pm 19,64$; 2) fluoxetina 10 mg/L: $88,5 \pm 72,25$ e 3) flumazenil 1,25 mg/L e fluoxetina 10 mg/L: $137,4 \pm 124$. As médias foram comparadas no teste de Kruskal-Wallis, mostrando $p \leq 0,01$, seguido do teste post-hoc de Dunn, indicando diferença entre os grupos: controle x fluoxetina 10mg/L ($p \leq 0,05$) e controle x flumazenil 1,25 mg/L e fluoxetina 10mg/L ($p \leq 0,01$). Gráfico 7.

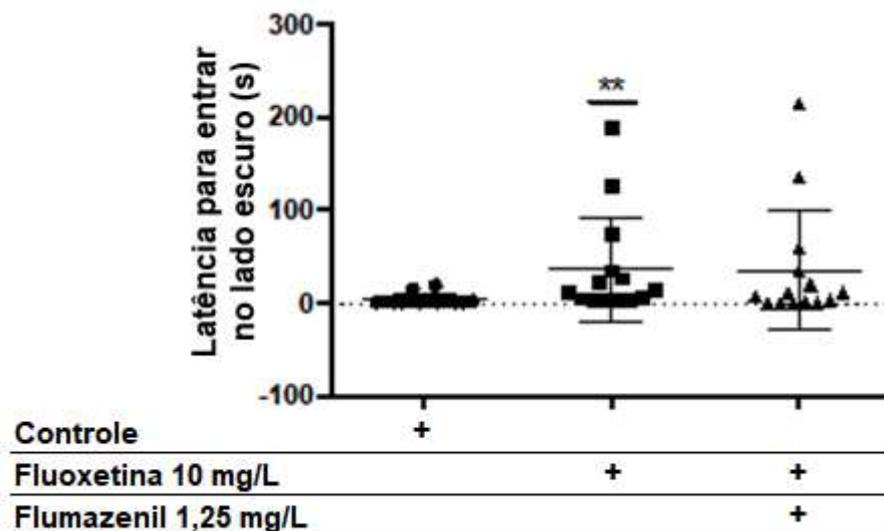
Gráfico 7 - Tempo de permanência no lado claro após tratamento com fluoxetina e/ou flumazenil seguido de fluoxetina



Fonte: A autora. Cada ponto no gráfico indica o valor de um animal. (s): segundos; *: $p \leq 0,05$, comparado ao grupo controle; **: $p \leq 0,01$, comparado ao grupo controle.

Latência para primeira entrada no compartimento escuro: 1) controle negativo: $3,357 \pm 5,839$; 2) fluoxetina 10 mg/L: $36,86 \pm 55,85$ e 3) flumazenil 1,25 mg/L e fluoxetina 10 mg/L: $35,86 \pm 63,24$. As médias foram analisadas pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste post-hoc de Dunn e essa análise mostrou diferença estatística entre o grupo controle e fluoxetina 10mg/L ($p < 0,01$). Gráfico 8.

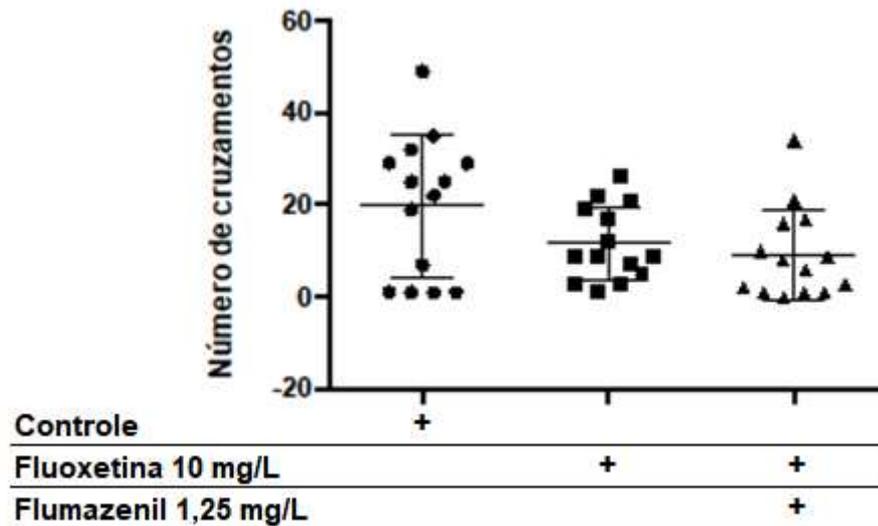
Gráfico 8 - Latência para primeira entrada no compartimento escuro após tratamento com fluoxetina e/ou flumazenil seguido de fluoxetina



Fonte: A autora. Cada ponto no gráfico indica o valor de um animal. (s): segundos; **: $p \leq 0,01$, comparado ao grupo controle.

Número de cruzamentos entre os compartimentos claro e escuro: 1) controle negativo: $19,71 \pm 15,29$; 2) fluoxetina 10 mg/L: $11,64 \pm 8,006$ e 3) flumazenil 1,25 mg/L e fluoxetina 10 mg/L: $9,214 \pm 9,807$. As médias foram comparadas no teste estatístico de Kruskal-Wallis e não apresentaram diferença estatística, considerando $p \leq 0,05$. Gráfico 9.

Gráfico 9 - Número de cruzamentos entre os compartimentos após tratamento com fluoxetina e/ou flumazenil seguido de fluoxetina



Fonte: A autora. Cada ponto no gráfico indica o valor de um animal.

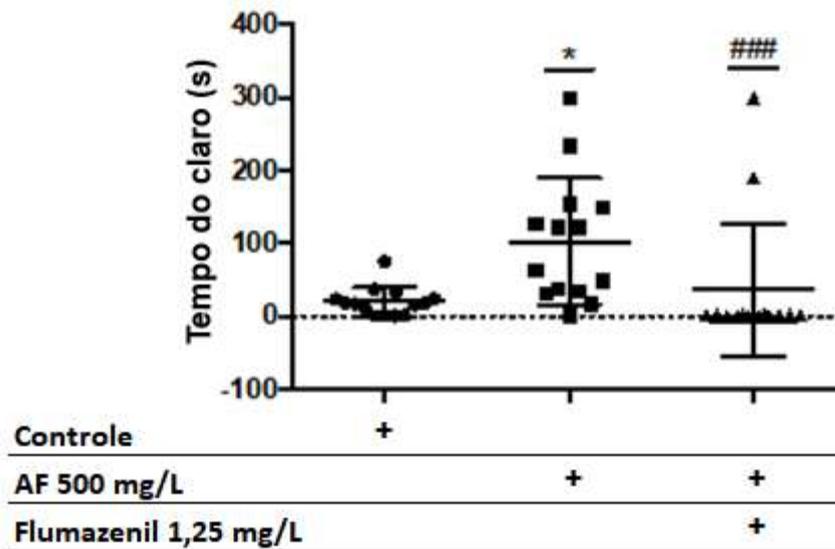
- *Fase 3:* verificação da relação do sistema gabaérgico na ação do AF.

Os resultados obtidos nessa fase foram (média \pm desvio padrão):

Tempo de permanência no compartimento claro: 1) controle negativo: $20 \pm 19,64$; 2) AF 500 mg/L: $102,9 \pm 86,99$ e 3) flumazenil 1,25 mg/L e AF 500 mg/L: $36,36 \pm 91,15$. Na avaliação das médias deste parâmetro, houve diferença entre os grupos ($p < 0,0006$, Kruskal-Wallis). No teste post-hoc de Dunn, verificamos as diferenças entre os grupos: controle x AF 500mg/L ($p \leq 0,05$) e AF 500mg/L x Flumazenil 1,25 mg/L e AF 500 mg/L ($p \leq 0,001$). Gráfico 10.

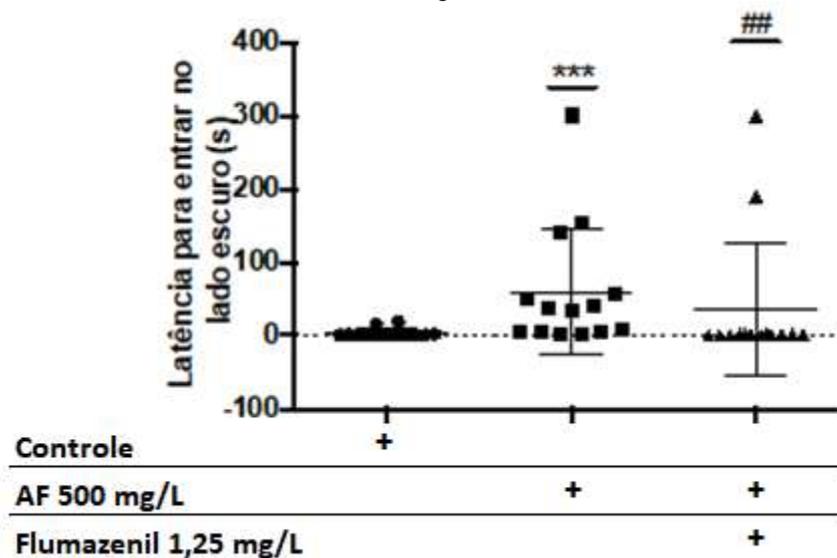
Latência para primeira entrada no compartimento escuro: 1) controle negativo: $3,357 \pm 5,839$; 2) AF 500 mg/L: $59,93 \pm 84,61$ e 3) flumazenil 1,25 mg/L e AF 500 mg/L: $35,93 \pm 91,16$. Comparando as médias no teste estatístico de Kruskal-Wallis, obtemos $p < 0,0001$, seguindo para o teste post-hoc de Dunn, verificamos as diferenças entre os grupos: controle x AF 500 mg/L ($p \leq 0,001$) e AF 500mg/L x flumazenil 1,25 mg/L e AF 500 mg/L ($p \leq 0,01$). Gráfico 11.

Gráfico 10 - Tempo de permanência no compartimento claro após tratamento com AF e/ou flumazenil seguido de AF



Fonte: A autora. Cada ponto no gráfico indica o valor de um animal.
(s): segundos; *: $p \leq 0,05$, comparado ao grupo controle; ###: $p \leq 0,001$, comparado ao grupo AF 500 mg/L.

Gráfico 11 - Latência para primeira entrada no compartimento escuro após tratamento com AF e/ou flumazenil seguido de AF

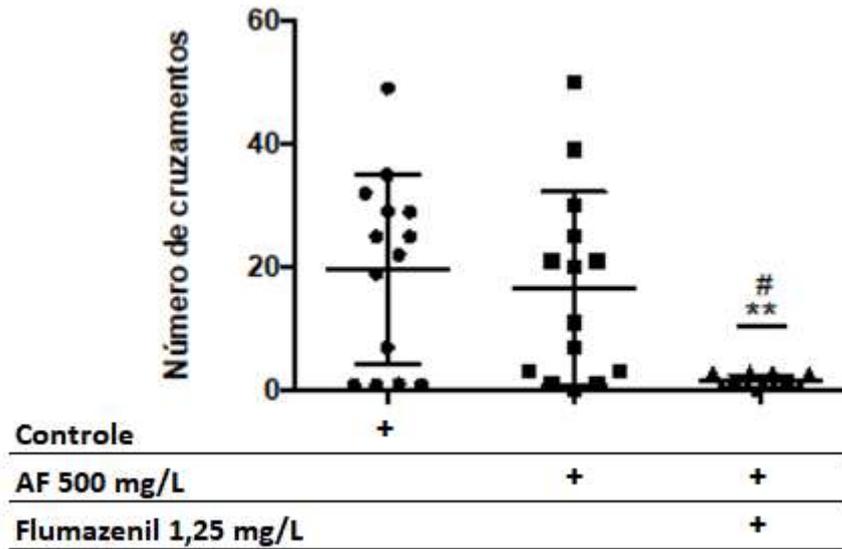


Fonte: A autora. Cada ponto no gráfico indica o valor de um animal.
(s): segundos; ***: $p \leq 0,001$, comparado ao grupo controle; ##: $p \leq 0,01$, comparado ao grupo AF 500 mg/L.

Número de cruzamentos entre os compartimentos claro e escuro: 1) controle negativo: $19,71 \pm 15,29$; 2) AF 500 mg/L: $16,57 \pm 15,62$ e 3) flumazenil 1,25 mg/L e AF 500 mg/L: $1,5 \pm 1,109$. Na avaliação deste parâmetro houve diferença estatística entre os grupos ($p \leq 0,01$, Kruskal-Wallis). No teste post-hoc de Dunn observamos as seguintes diferenças estatísticas: controle x Flumazenil

1,25 mg/L e AF 500 mg/L ($p \leq 0,01$) e AF 500mg/L x Flumazenil 1,25 mg/L e AF 500 mg/L ($p \leq 0,05$). Gráfico 12.

Gráfico 12 - Número de cruzamentos entre os compartimentos após tratamento com AF e/ou flumazenil seguido de AF



Fonte: A autora. Cada ponto no gráfico indica o valor de um animal.

** : $p \leq 0,01$, comparado ao grupo controle; #: $p \leq 0,05$, comparado ao grupo AF 500 mg/L

6 DISCUSSÃO

O estresse crônico é o principal fator patogênico da ansiedade e depressão humana. Por muito tempo os roedores foram os animais preferidos para pesquisa de ansiedade devido às suas semelhanças fisiológicas e genéticas com o organismo humano. Atualmente, o *zebrafish*, modelo economicamente mais viável, com facilidade de observação de diversos parâmetros e de manipulação genética, tem se mostrado muito útil como modelo animal para pesquisa em neurociência e descoberta de novas drogas que atuam no SNC. Além disso, testes como a preferência de claro ou escuro geram diferentes dados de forma prática, simples, econômica, segura e reprodutível. Os parâmetros são simples, mas com capacidade de detectar mudanças comportamentais distintas e comuns com o uso de diferentes fármacos ansiolíticos, tornando-os úteis para a avaliação do comportamento tipo ansiedade no *zebrafish*. Da mesma forma que os roedores têm aversão inata por ambientes iluminados, o *zebrafish* demonstra preferência por zonas escuras. Geralmente as drogas ansiolíticas induzem o aumento no número de entradas na área iluminada, assim como, o tempo de permanência e exploração deste compartimento enquanto que as drogas ansiogênicas provocam o efeito contrário (CAMPOS, 2016; GEBAUER et al., 2011; SONG et al., 2018).

O teste de preferência claro/escuro é um teste simples e indolor que não requer condicionamento, pois avalia as tendências naturais do *zebrafish*. A maneira de administrar os medicamentos nessa espécie é, geralmente, por imersão, o que é vantajoso para fármacos de metabolização rápida ou que requerem tratamento prolongado e, além de tudo, não envolve o estresse da injeção, o que pode alterar os dados comportamentais. Dessa forma, pode-se realizar o estudo não invasivo da atividade química de substâncias e selecionar potenciais drogas psiquiátricas (MAGNO et al., 2015).

6.1 TESTE DE ATIVIDADE ANSIOLÍTICA

O clonazepam é um BZD de início de ação rápido e, embora essa classe de fármacos seja reconhecida por ter maiores riscos de causar comprometimento da memória, dependência e sintomas de abstinência, eles continuam sendo uma

opção importante para pacientes com altos níveis de ansiedade. O clonazepam é um dos fármacos dessa classe mais amplamente utilizado no cenário clínico (WANG et al., 2016). A fluoxetina (ISRS) é muito utilizada para o tratamento de distúrbios de ansiedade e depressão. Esse fármaco promove a inibição da recaptação de serotonina na célula pré-sináptica, aumentando seu nível extracelular. A serotonina é um neurotransmissor envolvido na regulação do humor, apetite, sono, memória e aprendizagem e é associada a condições depressivas e de ansiedade. O tratamento agudo com fluoxetina é uma ferramenta neurofarmacológica útil para a visão do sistema serotoninérgico no estresse e comportamento agressivo do *zebrafish* adulto, como já mostrado por Theodoridi et al. (2017).

Como esperado, os animais tratados com clonazepam e fluoxetina, que são fármacos consolidados no tratamento dos transtornos de ansiedade, apresentaram um tempo de permanência no compartimento claro significativamente maior do que aqueles que não receberam tratamento. Magno et al. (2015) obtiveram resultado similar ao tratar o *zebrafish* com clonazepam 0,006 mg/L por 600 segundos, afirmando que o tratamento diminuiu o tempo no escuro, porém o tratamento agudo com fluoxetina nas concentrações de 2, 4 e 6 mg/L não diminuiu esse parâmetro. Da mesma forma, Maximino et al. (2011) observaram efeito ansiolítico do clonazepam na dose de 0,05 mg/kg no teste de claro/escuro modificado mas só observaram esse efeito para a fluoxetina quando o tratamento era crônico; o tratamento agudo na dose de 10 mg/kg não aumentou o tempo gasto no compartimento claro. Já no estudo de Abreu et al. (2017), foi observado diminuição do efeito ansiogênico na mesma espécie após tratamento agudo com fluoxetina (50 µg/L, imersão durante 15 minutos) nos testes de restrição espacial e perseguição, assim como no estudo de Maximino et al. (2014) na dose de 2,5 mg/kg (intraperitoneal) no teste de tanque novo, estando de acordo com os resultados encontrados em nosso experimento.

Os animais tratados com AF 100 mg/L não apresentaram comportamento do tipo menos ansioso em relação ao grupo controle, demonstrando que nessa concentração, o fármaco não possui efeito ansiolítico. Já os animais tratados com as concentrações maiores do mesmo fármaco, permaneceram por mais tempo no compartimento claro quando comparados aos animais do grupo controle, e

apresentaram comportamento semelhante aos grupos tratados com clonazepam e fluoxetina.

O teste claro/escuro tem sido usado como teste de ansiedade em roedores há muito tempo. Verificou-se que animais tratados com fármacos com ação ansiolítica aumentam o tempo gasto na área clara, enquanto que os ansiogênicos o diminuem. Da mesma forma, o *zebrafish* também mostra preferência por ambientes escuros, tornando esse parâmetro potencialmente útil para avaliar os efeitos dos ansiolíticos (GEBAUER et al., 2011). Os resultados encontrados confirmaram a preferência pelo lado escuro e a efetividade do BZD e da fluoxetina em aumentar o tempo gasto na zona clara. Assim como esses fármacos, o AF nas concentrações de 250 e 500 mg/L, também se mostrou efetivo no mesmo parâmetro, indicando que ele possui atividade ansiolítica.

Pode-se observar que a latência para a primeira entrada no compartimento escuro dos animais não tratados e dos tratados com AF 100 mg/L é semelhante. Já os animais que receberam todos os outros tratamentos demoraram mais tempo para a primeira entrada. Esse comportamento não pode ser sugerido como presença de alterações locomotoras, já que o número de cruzamentos entre os compartimentos não é diferente entre os grupos, mas pode ser sugerido como comportamento menos ansioso para entrar no compartimento escuro que lhe oferece mais segurança.

Giacomini et al. (2016) avaliaram os efeitos do estresse agudo em parâmetros comportamentais em *zebrafish*, expostos a fluoxetina e diazepam, utilizando outros testes, que não o teste claro/escuro. Num teste de avaliação locomotora, eles perceberam que o estresse aumenta a atividade locomotora e que a fluoxetina e o diazepam não a afetam por si, mas revertem as mudanças comportamentais induzidas pelo protocolo de estresse agudo utilizado por eles, sugerindo que os efeitos desses fármacos podem ser de bloqueio das respostas do cortisol em resposta ao estresse agudo. Esses dois fármacos não causaram sedação ou efeitos colaterais relevantes no estudo citado, assim como no presente estudo, em que utilizamos o mesmo ISRS e um BDZ, o clonazepam ao invés do diazepam. Se os fármacos tivessem causado sedação, o número de cruzamentos seria menor comparado ao grupo controle.

Em um estudo mais aprofundado que analisou *zebrafish* com mutação no receptor de glicocorticóide (RG), que regula a transcrição de genes alvo

específicos após a ligação do cortisol, Ziv et al. (2013) afirmam que com essa mutação, o *feedback* negativo sobre a resposta do cortisol é interrompido; como consequência o cortisol é elevado, mas incapaz de sinalizar através do RG. O tratamento prolongado (2 semanas) com fluoxetina consegue corrigir os níveis de cortisol, no entanto esse efeito é mais consequência do que causa do sucesso do tratamento com esse fármaco.

Baseado na afirmação de Bourin e Hascoët (2003), que o aumento de tempo gasto no compartimento iluminado após tratamento com um fármaco é sugerido como índice de atividade ansiolítica, podemos sugerir que o AF é capaz de diminuir o comportamento do tipo ansiedade no *zebrafish* da mesma maneira que a fluoxetina e o clonazepam.

6.2 ENVOLVIMENTO DO SISTEMA GABAÉRGICO NO MECANISMO DE AÇÃO DO AF

- *Fase 1*: determinação da concentração efetiva de flumazenil no bloqueio do clonazepam 0,75 mg/L (controle positivo).

Tendo como resultado que o AF apresenta atividade ansiolítica, partimos para a suposição do seu mecanismo de ação. Pensando que ele poderia agir através sítio de ligação do benzodiazepínico no receptor GABA, o flumazenil foi escolhido para seguir o teste. Inicialmente, foi necessário determinar a dose desse fármaco que era capaz de bloquear o efeito do clonazepam na concentração utilizada como controle positivo nos testes (0,75 mg/L).

O flumazenil é um antagonista específico do sítio do benzodiazepínico no receptor GABA_A e antagoniza os efeitos dos benzodiazepínicos, incluindo os efeitos ansiolíticos, sedativos e hipnóticos e, portanto, é uma boa ferramenta para a pesquisa de fármacos que agem nesse receptor (BENNEH et al., 2017).

Para estudos em ratos, as concentrações de flumazenil, diazepam e clonazepam são bem conhecidas, já para o *zebrafish* a quantidade de estudos publicados envolvendo esses fármacos é menor, sendo necessária a execução de testes pilotos e maior quantidade de estudos para serem melhor definidas.

Nessa fase, o grupo que recebeu o tratamento com o clonazepam tem um maior tempo de permanência em relação ao grupo controle. Em comparação a

esse grupo, pode-se ver que o grupo pré-tratado com flumazenil 1,25 mg/L reduziu muito o tempo na área clara, assemelhando-se ao controle. Já o grupo pré-tratado com flumazenil 1 mg/L, não teve redução significativa desse parâmetro. Sendo assim, a concentração de 1,25 mg/L foi mais eficaz para antagonizar os efeitos do BZD na concentração testada. Os outros dois parâmetros analisados, a latência para a primeira entrada no compartimento escuro e o número de cruzamentos entre as áreas, não apresentaram diferenças estatísticas.

- *Fase 2:* verificação da especificidade do efeito do flumazenil em bloquear os efeitos de fármacos que atuam no sítio de ligação de benzodiazepínico no receptor GABA_A.

Da mesma forma que Viswanatha et al. (2017), escolhemos o flumazenil para sugerir o possível mecanismo de ação do AF. Na fase 1 foi comprovado que ele bloqueia o efeito do BZD utilizado, validando o procedimento teste. Na fase 2, o objetivo foi verificar se o flumazenil poderia atuar em outro tipo de receptor que não o GABA_A. Por esse motivo, foi realizado o mesmo teste da fase 1 com pré-tratamento de flumazenil na concentração efetiva e tratamento com fluoxetina 10 mg/L, que é um fármaco que inibe a recaptação de serotonina.

Nossos resultados são mostrados nos gráficos 7 a 9 e confirmam que este antagonista de BZD não exerce influência sobre a ação do ISRS, já que não há diferença significativa em nenhum dos 3 parâmetros analisados entre os grupos tratados apenas com fluoxetina e o que recebeu o pré-tratamento com flumazenil.

Esse resultado era esperado e está de acordo com os estudos de especificidade de ligação dos BZD ao seu sítio de ligação no receptor GABA_A, como mostrados nos resultados de Li et al. (2006) e Vinkers et al. (2012).

Cada um dos sistemas, gabaérgico e serotoninérgico, possui alvos específicos e fármacos capazes de reverter ação dos agonistas. Os resultados que obtivemos são coerentes com estudos já publicados, indicando que o flumazenil é específico para antagonizar o efeito de BZD e que não tem influência na ação de fármacos que atuam em outros receptores.

- *Fase 3:* verificação da relação do sistema gabaérgico na ação do AF.

A forma mais frequentemente utilizada para verificação do envolvimento gabaérgico na ação de substâncias em estudo para ansiedade, é a administração do flumazenil para verificar se existe o bloqueio dos efeitos ansiolíticos previamente observados em estudos comportamentais. O diazepam e o clonazepam são os fármacos comumente usados como controles positivos nesses testes. Além de estudos relacionados a ansiedade, esses fármacos são, também, utilizados na pesquisa de novas substâncias anticonvulsivantes. Alguns estudos que utilizaram essa linha de pesquisa são Abdelhalim et al. (2015), Chaves et al. (2017), Tabari, Amir e Tehrani (2017), Vinkers et al. (2012) e Viswanatha et al. (2017).

Após encontrarmos que a concentração efetiva de flumazenil para antagonizar o efeito do controle positivo é de 1,25 mg/L e que ele é específico para bloquear o efeito de fármacos que agem em receptor GABAA, seguimos para a verificação da sua capacidade em reverter a ação do AF. Nessa fase foi realizado o teste com controle negativo, AF 500 mg/L e o grupo com pré-tratamento de flumazenil 1,25 mg/L seguido de tratamento com AF 500 mg/L, a fim de comparar os efeitos do fármaco e do possível bloqueio com o antagonista de BDZ no receptor GABA_A.

Analisando os gráficos, podemos ver que o pré-tratamento com flumazenil diminuiu significativamente o tempo gasto no lado claro, assim como a latência para a primeira entrada no lado escuro e o número de cruzamentos. Isso indica que houve bloqueio da ação do AF. Esse bloqueio da ansiólise por pré-tratamento com flumazenil sugere envolvimento do receptor GABA_A nos efeitos ansiolíticos do AF e o experimento anterior, com a fluoxetina, reforça essa sugestão, já que mostra a especificidade do flumazenil.

Xu et al. (2013) investigaram o efeito do AF na dor induzida por reserpina e comportamentos semelhantes a depressão em camundongos. O AF era administrado por gavagem 30 minutos antes do teste. Nesse estudo, aplicaram um teste específico para avaliação de atividade locomotora, realizada em um ambulômetro com 5 câmaras de atividade. Os camundongos foram colocados nas câmaras e suas patas foram contatadas ou desconectadas das barras ativas produzindo configurações aleatórias que foram convertidas em pulsos. Os pulsos, que eram proporcionais à atividade locomotora dos camundongos, foram registrados automaticamente como contagens cumulativas totais de atividade

motora. Nenhuma dose de AF (5 a 80 mg/kg) afetou a atividade locomotora em doses que influenciaram significativamente a resposta à imobilidade nos testes de suspensão pela cauda e de natação forçada. Da mesma forma, nos testes que realizamos não houve diferença no número de cruzamentos entre os lados do aquário nos animais tratados com o AF e os não tratados, com exceção desse último teste do grupo que recebeu pré-tratamento com flumazenil seguido de tratamento com AF 500 mg/L. Assim, estamos de acordo com esse estudo em que afirma que o AF não afeta a atividade locomotora.

Celik et al. (1999) realizaram um estudo em que analisaram os efeitos do flumazenil (5, 10 e 20 mg/kg administrado via intraperitoneal) sobre a atividade locomotora em ratos. Concluíram que o flumazenil não tem efeito sobre a atividade locomotora mas que consegue reverter a depressão locomotora causada pela administração de diazepam.

Tanto o AF quanto o flumazenil não exercem efeito sobre a atividade locomotora. Em nosso teste, percebemos que o número de cruzamentos foi significativamente menor nos peixes que receberam tratamento com esses dois fármacos associados. Assim, sugerimos que essa diminuição não foi por efeito locomotor, mas pelo bloqueio do efeito ansiolítico do AF.

Em relação ao mecanismo de ação, em 2015, Machado et al. desenvolveram um estudo com o isopentil ferulato, um éster do AF, no qual pesquisaram a capacidade anticonvulsivante do fármaco e seu mecanismo de ação. Após comparar os resultados obtidos com o tratamento do fármaco teste e diazepam, verificaram a existência da atividade anticonvulsivante e utilizaram o flumazenil para testar se bloquearia esse efeito. O resultado foi de bloqueio do efeito, sugerindo atuação em sítio modulatório de BZD no receptor GABAA no cérebro de camundongos. Ainda que esse estudo tenha sido realizado com um derivado éster, ele corrobora com o nosso achado de envolvimento gabaérgico no mecanismo de ação do AF.

7 CONCLUSÃO

Analisando os resultados obtidos, pode-se afirmar que o AF apresenta atividade ansiolítica e sua ação aparentemente ocorre por meio de interação com o receptor GABAA em *zebrafish*, utilizando o teste de preferência claro/escuro.

REFERÊNCIAS

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. **DSM-5: manual diagnóstico e estatístico de transtornos mentais**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014. 992p.

Associação Brasileira de Psiquiatria. **Transtornos de Ansiedade: Diagnóstico e Tratamento**. 2008.

ABDELHALIM, A. et al. Antidepressant, anxiolytic and antinociceptive activities of constituents from *rosmarinus officinalis*. **Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 18, n. 4, p. 448–459, 2015.

ABREU, M. S. et al. Divergent effect of fluoxetine on the response to physical or chemical stressors in zebrafish. **PeerJ**, v. 5, p. e3330, 2017.

AZAY-MILHAU, J. et al. Antihyperglycemic effect of a natural chicoric acid extract of chicory (*Cichorium intybus* L.): A comparative in vitro study with the effects of caffeic and ferulic acids. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 150, n. 2, p. 755–760, 2013.

BANDELOW, B.; MICHAELIS, S.; WEDEKIND, D. Treatment of anxiety disorders. **Dialogues Clin Neurosci**, v. 19, n. 2, p. 93–107, 2017.

BENNEH, C. K. et al. *Maerua angolensis* stem bark extract reverses anxiety and related behaviours in zebra fish — Involvement of GABAergic and 5-HT systems. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 207, p. 129–145, 2017.

BOURIN, M.; HASCOËT, M. The mouse light-dark box test. **European Journal of Pharmacology**, v. 463, n. 1–3, p. 55–65, 2003.

BOUZID, M. A. et al. Lifelong Voluntary Exercise Modulates Age-Related Changes in Oxidative Stress. **International Journal of Sports Medicine**, v. 39, n. 1, p. 21–28, 2018.

BRADY, S. T. et al. **Basic Neurochemistry: Principles of molecular, cellular and medical neurobiology**. 8. ed. Waltham: Elsevier, 2012. 1096 p.

BRUNTON L. L., LAZO, J. S., PARKER, K. L. **Goodman & Gilman. As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 11ª ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2012.

CAMPOS, E. G. **“Zebrafish como organismo-modelo para análises de efeitos comportamentais e toxicológicas da cetamina empregando cromatografia em fase gasosa e estatística multivariada”**. 2016, 72 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

CELIK, T. et al. The effects of flumazenil on two way active avoidance and locomotor activity in diazepam-treated rats. **European neuropsychopharmacology: the journal of the European College of Neuropsychopharmacology**, v. 9, n. 1–2, p. 45–50, 1999.

CHAVES, E. M. C. et al. The anxiolytic-like effect of 6-styryl-2-pyrone in mice involves GABAergic mechanism of action. **Metabolic Brain Disease**, v. 33, n. 1, p. 139–149, 2017.

CHEN, J. et al. Antidepressant-like effects of ferulic acid: involvement of serotonergic and norepinephrine systems. **Metabolic Brain Disease**, n. 30, p. 129–136, 2015.

CZAPINSKI, P.; BLASZCZYK, B.; CZUCZWAR, S. J. Mechanisms of action of antiepileptic drugs. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 5, p. 3–14, 2005.

GEBAUER, D. L. et al. Effects of anxiolytics in zebrafish: similarities and differences between benzodiazepines, buspirone and ethanol. **Pharmacology, biochemistry, and behavior**, v. 99, n. 3, p. 480–6, 2011.

GIACOMINI, A. C. V. V et al. Fluoxetine and diazepam acutely modulate stress induced-behavior. **Behavioural Brain Research**, v. 296, p. 301–310, 2016.

GOHIL, K. J.; KSHIRSAGAR, S. B.; SAHANE, R. S. Ferulic acid – A comprehensive pharmacology of an important bioflavonoid. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 3, n. 1, p. 700–710, 2012.

GOLAN, D. E.; ARMSTRONG, E. J.; ARMSTRONG, A. W. **Principles of Pharmacology : The Pathophysiologic Basis of Drug Therapy**. 4 ed. Philadelphia: Wolters Kluwer Health, 2017.

GRAF, E. Antioxidant potential of ferulic acid. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 13, n. 4, p. 435–448, 1992.

HAHN, H. J. et al. Pretreatment of Ferulic Acid Protects Human Dermal Fibroblasts against Ultraviolet A Irradiation. **Annals of Dermatology**, v. 28, n. 6, p. 740–748, 2016.

HASSANZADEH, P. et al. Ferulic acid exhibits antiepileptogenic effect and prevents oxidative stress and cognitive impairment in the kindling model of epilepsy. **Life Sciences**, v. 179, p. 9–14, 2016.

HEID, J. et al. Age-dependent increase of oxidative stress regulates microRNA-29 family preserving cardiac health. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 16839, 2017.

HILL, A. J. et al. Zebrafish as a model vertebrate for investigating chemical toxicity. **Toxicological Sciences**, v. 86, n. 1, p. 6–19, 2005.

HONG, Q. et al. Antithrombotic activities of ferulic acid via intracellular cyclic nucleotide signaling. **European Journal of Pharmacology**, v. 777, p. 1–8, 2016.

HOWE, K. et al. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. **Nature**, v. 496, n. 7446, p. 498–503, 2013.

JIN, Y. et al. Neuroprotection by sodium ferulate against glutamate-induced apoptosis is mediated by ERK and PI3 kinase pathways. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 28, n. 12, p. 1881–1890, 2007.

KALUEFF, A. V.; STEWART, A. M.; GERLAI, R. Zebrafish as an emerging model for studying complex brain disorders. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 35, n. 2, p. 63–75, 2014.

KESKIN GULER, S. et al. Antioxidative-oxidative balance in epilepsy patients on antiepileptic therapy: a prospective case-control study. **Neurological Sciences**, v. 37, n. 5, p. 763–767, 2016.

KHAN, K. M. et al. Zebrafish models in neuropsychopharmacology and CNS drug discovery. **British Journal of Pharmacology**, v. 174, p. 1925–1944, 2017.

KUMAR, A.; CHANANA, P. Role of Nitric Oxide in Stress-Induced Anxiety: From Pathophysiology to Therapeutic Target. **Vitamins and Hormones**, v. 103, p. 147–167, 2017.

KUMAR, N.; PRUTHI, V. Potential applications of ferulic acid from natural sources. **Biotechnology Reports**, v. 4, n. 1, p. 86–93, 2014.

LENZE, E. J.; WETHERELL, J. L. A Lifespan view of anxiety disorders. **Dialogues in Clinical Neuroscience**, v. 13, n. 4, p. 381–399, 2011.

LI, G. et al. Synergistic antidepressant-like effect of ferulic acid in combination with piperine: involvement of monoaminergic system. **Metabolic Brain Disease**, v. 30, n. 6, p. 1505–1514, 2015.

LI, J. et al. Comparison of in vivo and ex vivo [³H]flumazenil binding assays to determine occupancy at the benzodiazepine binding site of rat brain GABAA receptors. **Neuropharmacology**, v. 51, n. 1, p. 168–172, 2006.

LI, W. et al. Biological activity evaluation and structure–activity relationships analysis of ferulic acid and caffeic acid derivatives for anticancer. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 22, n. 19, p. 6085–6088, 2012.

LIU, Y. M. et al. Elevation of synaptic protein is associated with the antidepressant-like effects of ferulic acid in a chronic model of depression. **Physiology and Behavior**, v. 169, p. 184–188, 2017.

MACHADO, K. C. et al. Anticonvulsant and behavioral effects observed in mice following treatment with an ester derivative of ferulic acid: Isopentyl ferulate. **Chemico-Biological Interactions**, v. 242, p. 273–279, 2015.

MAGNO, L. D. P. et al. Pharmacological study of the light/dark preference test in zebrafish (*Danio rerio*): Waterborne administration. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 135, p. 169–176, 2015.

MAKHIIJA, D.; JAGTAP, A. Studies on sensitivity of zebrafish as a model organism for Parkinson's disease: Comparison with rat model. **Journal of Pharmacology and Pharmacotherapeutics**, v. 5, n. 1, p. 39, 2014.

MANCUSO, C.; SANTANGELO, R. Ferulic acid: pharmacological and toxicological

aspects. **Food and chemical toxicology**, v. 65, p. 185–95, 2014.

MAXIMINO, C. et al. Pharmacological analysis of zebrafish (*Danio rerio*) scototaxis. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 35, n. 2, p. 624–631, 2011.

MAXIMINO, C. et al. Fluoxetine and WAY 100,635 dissociate increases in scototaxis and analgesia induced by conspecific alarm substance in zebrafish (*Danio rerio* Hamilton 1822). **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 124, p. 425–433, 2014.

METCALFE, N. B.; ALONSO-ALVAREZ, C. Oxidative stress as a life-history constraint: the role of reactive oxygen species in shaping phenotypes from conception to death. **Functional Ecology**, v. 24, n. 5, p. 984–996, 2010.

NADAL, J. M. “**Desenvolvimento tecnológico, caracterização e avaliação *in vitro* e *in vivo* de sistemas poliméricos contendo ácido ferúlico**”. 2016, 248 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2016.

OLEXOVÁ, L.; STEFÁNIK, P.; KRSKOVÁ, L. Increased anxiety-like behaviour and altered GABAergic system in the amygdala and cerebellum of VPA rats — An animal model of autism. **Neuroscience Letters**, v 629, p. 9-14, 2016.

POQUET, L.; CLIFFORD, M. N.; WILLIAMSON, G. Transport and Metabolism of Ferulic Acid through the Colonic Epithelium. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 36, n. 1, p. 190–197, 2008.

RIPKA, G. P.; SANTOS, R. S. **Estudo dos efeitos ansiolítico e antidepressivo do ácido ferúlico em ratos**. 2014, 56 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) – Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2014.

ROMANOWSKI, K. L. **Avaliação da participação da síntese de óxido nítrico no efeito ansiolítico do ácido ferúlico em ratos**. 2014, 46 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Enfermagem) – Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2014.

SANT`ANNA, M. C. B. **Zebrafish (*Danio rerio*) como modelo para estudo da toxicidade induzida pelo ferro**. 2009, 58 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular Molecular) - Faculdade de Biociências, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande Do Sul, Porto Alegre, 2009.

SHAMS, S. et al. The zebrafish as a promising tool for modeling human brain disorders: A review based upon an IBNS Symposium. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, 2017.

SONG, C. et al. Modeling consequences of prolonged strong unpredictable stress in zebrafish: Complex effects on behavior and physiology. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 81, p. 384–394, 2018.

STEENKAMP, L. R. et al. Severity of anxiety- but not depression- is associated with

oxidative stress in Major Depressive Disorder. **Journal of affective disorders**, v. 219, p. 193–200, 2017.

STEWART, A. M. et al. Zebrafish models for translational neuroscience research: From tank to bedside. **Trends in Neurosciences**, v. 37, n. 5, p. 264–278, 2014.

SULTANA, R. Ferulic acid ethyl ester as a potential therapy in neurodegenerative disorders. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1822, n. 5, p. 748–52, 2012.

TABARI, M. A.; AMIR, M.; TEHRANI, B. Evidence for the involvement of the GABAergic, but not serotonergic transmission in the anxiolytic-like effect of bisabolol in the mouse elevated plus maze. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol**, n. 309, p. 1041–1046, 2017.

THEODORIDI, A.; TSALAFOUTA, A.; PAVLIDIS, M. Acute exposure to fluoxetine alters aggressive behavior of zebrafish and expression of genes involved in serotonergic system regulation. **Frontiers in Neuroscience**, v. 11, p. 1–9, 2017.

TU, Y. et al. Ferulic acid potentiates pentobarbital-induced sleep via the serotonergic system. **Neuroscience Letters**, v. 525, n. 2, p. 95–99, 2012.

UTTARA, B. et al. Oxidative stress and neurodegenerative diseases: a review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options. **Current neuropharmacology**, v. 7, n. 1, p. 65–74, 2009.

VAN VELZEN, L. S. et al. Oxidative stress and brain morphology in individuals with depression, anxiety and healthy controls. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 76, p. 140–144, 2017.

VIANNA, M. **Ethical and practical considerations when using zebrafish**. Curso de manejo. Pontifícia Universidade Católica do do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2012.

VINKERS, C. H. et al. GABAA receptor α subunits differentially contribute to diazepam tolerance after Chronic treatment. **PLoS ONE**, v. 7, n. 8, 2012.

VISWANATHA, G. L. et al. *Achyranthes aspera* Attenuates epilepsy in experimental animals: possible involvement of GABAergic mechanism. **Metabolic Brain Disease**, p. 1–13, 2017.

WANG, S. M. et al. The efficacy and safety of clonazepam in patients with anxiety disorder taking newer antidepressants: A multicenter naturalistic study. **Clinical Psychopharmacology and Neuroscience**, v. 14, n. 2, p. 177–183, 2016.

WELLS B. G. et al. **Manual de Farmacoterapia**. 9 ed. Porto Alegre: AMGH, 2016. 964 p.

WONGSAMITKUL, N. et al. α subunits in GABA A receptors are dispensable for GABA and diazepam action. **Scientific Reports**, p. 1–11, 2017.

World Health Organization. **Depression and Other Common Mental Disorders:**

Global Health Estimates. Geneva, 2017.

XU, Y. et al. Ferulic acid increases pain threshold and ameliorates depression-like behaviors in reserpine-treated mice: Behavioral and neurobiological analyses. **Metabolic Brain Disease**, v. 28, n. 4, p. 571–583, 2013.

YAN, J.-J. et al. Protection against β -amyloid peptide toxicity *in vivo* with long-term administration of ferulic acid. **British Journal of Pharmacology**, v. 133, n. 1, p. 89–96, 2001.

Zebrafish Disease Models Society. Zebrafish and Human Disease. Disponível em: <<http://zdm-society.org/zebrafish-and-human-disease/>>. Acesso: 21 novembro de 2017.

ZENI, A. L. B. et al. Ferulic acid exerts antidepressant-like effect in the tail suspension test in mice: Evidence for the involvement of the serotonergic system. **European Journal of Pharmacology**, v. 679, n. 1–3, p. 68–74, 2012.

ZENI, A. L. B.; CAMARGO, A.; DALMAGRO, A. P. Ferulic acid reverses depression-like behavior and oxidative stress induced by chronic corticosterone treatment in mice. **Steroids**, v. 125, p. 131–136, 2017.

ZHAO, J. et al. Ferulic acid enhances the vasorelaxant effect of epigallocatechin gallate in tumor necrosis factor- α -induced inflammatory rat aorta. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 25, n. 7, p. 807–814, 2014.

ZHAO, Z.; EGASHIRA, Y.; SANADA, H. Ferulic acid sugar esters are recovered in rat plasma and urine mainly as the sulfoglucuronide of ferulic acid. **The Journal of nutrition**, v. 133, n. 5, p. 1355–1361, 2003.

ZHAO, Z.; EGASHIRA, Y.; SANADA, H. Ferulic acid is quickly absorbed from rat stomach as the free form and then conjugated mainly in liver. **The Journal of nutrition**, p. 3083–3088, 2004.

ZHAO, Z.; MOGHADASIAN, M. H. Chemistry, natural sources, dietary intake and pharmacokinetic properties of ferulic acid: A review. **Food Chemistry**, v. 109, n. 4, p. 691–702, 2008.

ZIV, L. et al. An affective disorder in zebrafish with mutation of the glucocorticoid receptor. **Molecular Psychiatry**, v. 18, n. 6, p. 681–691, 2013.