

AÇÕES DO TIPO ANTIDEPRESSIVA E ANSIOLÍTICA DAS RAÍZES DE *PF AFFIA GLOMERATA* EM CAMUNDONGOS

Jadyellen Rondon e Silva; Cíntia Nara Paiva da Silva; Samuel Correa; Nair Honda Kawashita; Bibiana Mozzaquatro Gai.

Universidade Federal de Mato Grosso, UFMT, jrondon586@gmail.com

Introdução

A depressão é uma doença psiquiátrica caracterizada por sentimentos de tristeza, culpa, baixa autoestima, fadiga, entre outros sintomas emocionais e físicos. A co-morbidade depressão/ansiedade é bastante comum atualmente, acomete uma parcela significativa da população e resulta em prejuízo da vida social (Hamon e Blier, 2013). A definição da palavra ansiedade, que significa ânsia, sufocamento e opressão, vem de um conjunto de respostas comportamentais e fisiológicas que evoluíram para proteger o indivíduo do perigo. Clinicamente, ela se caracteriza por um estado de agitação, preocupação ou angústia, que também causa debilitação física e mental (Hamon e Blier, 2013). As drogas disponíveis atualmente para o tratamento destas doenças apresentam efeitos colaterais e muitos pacientes são refratários a essas terapias; cerca de 30% a 50% dos casos de depressão não respondem suficientemente ao tratamento (Hamon e Blier, 2013). Os fármacos ansiolíticos são conhecidos por causar sonolência, confusão mental, dificuldade de raciocínio e desorientação, além de reações paradoxais como alucinações e mania (Birur et al., 2017), o que contribui para a descontinuação do tratamento. Nesse sentido, torna-se importante a pesquisa por novas substâncias com ações antidepressivas e ansiolíticas, que futuramente possam ser usadas como agente terapêutico principal, ou ainda em combinação com as drogas atualmente disponíveis.

A *Pfaffia glomerata* é uma espécie vegetal amplamente distribuída por todo o pantanal mato-grossense, comumente utilizada pela população ribeirinha como tônico e agente estimulante. Ela faz parte de um grupo de plantas conhecidas como ginsengs brasileiros em função das propriedades e efeitos biológicos similares ao ginseng asiático (Taniguchi et al., 1997); dentre as atividades farmacológicas já comprovadas para a *Pfaffia glomerata* estão as ações antinociceptivas, anti-inflamatórias e nootrópicas (Teixeira et al., 2006; Freitas et al., 2009; Marques et al., 2004). No entanto, poucos trabalhos têm se dedicado ao estudo dos seus efeitos sobre sintomas relacionados a doenças psiquiátricas.

Nesse sentido, o objetivo deste estudo consistiu em avaliar se o tratamento agudo com extrato hidroetanólico obtido das raízes da *Pfaffia glomerata* apresenta ações capazes de atenuar sintomas relacionados à depressão e ansiedade em modelos experimentais em camundongos.

Metodologia

Obtenção do extrato vegetal: A raiz da planta *Pfaffia glomerata* foi coletada na Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT) – Campos de Cuiabá, na segunda quinzena do mês de maio de 2016. O material foi lavado com água corrente em abundância e posteriormente seco em estufa durante cinco dias. Após seco, o material foi triturado com o auxílio de um moinho de facas até sua total transformação em pó. O pó foi então dissolvido álcool 70%, onde foi macerado durante sete dias. Após esse período, a solução foi filtrada a vácuo e posteriormente o solvente foi

evaporado a 40°C durante 4 horas; o material foi liofilizado por cerca de 8 horas, para a obtenção do extrato hidroetanólico sólido.

Animais: Foram utilizados camundongos machos Swiss pesando entre 20 e 30g, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT). Todos os testes foram realizados com grupos separados de animais (n de 6 a 8 camundongos por grupo) e cada animal foi usado apenas uma vez em cada teste. Os experimentos foram conduzidos de acordo com as normas do Comitê de Ética e Bem-Estar Animal da UFMT (projeto nº 298/2017).

Teste da Suspensão da Cauda (TSC): Este teste foi utilizado na investigação do efeito do tipo antidepressivo da *Pfaffia glomerata* em camundongos. O tempo total de imobilidade induzido pela suspensão da cauda foi medido de acordo com os métodos descritos por Steru et al. (1985). Os animais foram suspensos 50 cm do chão por uma fita adesiva fixada cerca de 1 cm antes da ponta da cauda. Os parâmetros observados foram a latência para o primeiro episódio de imobilidade e o tempo total de imobilidade durante um período total de 6 minutos.

Teste do nado forçado (TNF): O procedimento foi realizado de acordo com o método descrito por Porsolt et al. (1977), e consistiu em colocar o camundongo num cilindro (35 cm de altura x 10,5 cm de diâmetro) contendo aproximadamente cerca de 28cm de altura de água, mantida a 25±2° C. Os parâmetros observados foram a latência para o primeiro episódio de imobilidade e o tempo total de imobilidade durante um período total de 6 minutos.

Teste do claro-escuro (TCE): O TCE foi realizado de acordo com o método descrito por Crawley e Goodwin (1981). O aparato deste teste é composto por uma caixa dividida em dois compartimentos: um menor, escuro; e um maior, com paredes brancas e iluminação direta. Os dois compartimentos são separados por uma divisória, com uma pequena porta central. Cada camundongo foi colocado no centro da parte iluminada, permitindo-o explorar livremente os dois compartimentos durante 5 minutos. O tempo de permanência no compartimento escuro e o número de transições entre os compartimentos foram observados.

Teste do campo aberto (TCA): Na condução deste teste, o animal foi colocado entre os quadrantes centrais de uma caixa confeccionada em madeira (45 cm x 45 cm x 45 cm) com o piso dividido em 16 quadrados de iguais dimensões. O número de linhas cruzadas (“*crossing*”) e o número de vezes que o animal se levantou nas patas traseiras (“*rearing*”) foram contados durante 5 minutos e tomados como um indicativo de atividade locomotora e exploratória (Walsh e Cummins, 1976).

Procedimento experimental:

a) *Curva de tempo:* A fim de identificar o tempo no qual o extrato desempenhou seus efeitos do tipo antidepressivo a ansiolítico máximos, os animais foram tratados com uma dose de 500 mg/kg (via intragástrica, i.g.) na proporção de 1 ml/kg, dissolvido em água destilada. Nos tempos de 15 min, 30 min, 60 min e 120 min após a administração, os animais foram avaliados nos TSC, TNF e TCE.

b) *Curva dose-resposta:* A fim de identificar a menor dose em que o extrato apresentou seus efeitos do tipo antidepressivo e ansiolítico, diferentes grupos de animais foram tratados pela via i.g. (1 ml/kg) nas doses de 125, 250 e 500 mg/kg. Após o tempo pré-estabelecido (30 min para TSC, 120 min para TNF e 120 min para TCE), os animais foram avaliados em cada teste.

Na investigação da influência da *Pfaffia glomerata* sobre as atividades locomotora e exploratória dos animais, os camundongos foram tratados pela via i.g. (1 ml/kg) com a dose de 500 mg/kg e 15 min, 30 min, 60 min e 120 min após a administração foram avaliados no TCA. Num segundo momento, os animais foram tratados com as doses de 125, 250 e 500 mg/kg e avaliados no TCA após 30 min ou 120 min.

Análise estatística

Os dados obtidos foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). A normalidade dos dados foi testada pelo teste de D'Agostino e Person. Os dados foram analisados por análise de variância de uma via (ANOVA), seguida pelo teste post-hoc de Newman-Keuls quando apropriado. Valores de $P < 0,05$ foram considerados significativos.

Resultados

TSC: O tratamento com o extrato na dose de 500 mg/kg aumentou de forma significativa a latência para o primeiro episódio de imobilidade no TSC a partir do tempo de 15 minutos (48%), quando comparado ao grupo controle. De modo semelhante, o tempo total de imobilidade foi reduzido pelo tratamento agudo com *Pfaffia glomerata* a partir de 15 minutos (40%). O aumento da latência e a redução do tempo total de imobilidade no TSC perduraram até 120 minutos após a administração do extrato. Os resultados demonstram um aumento de cerca de 56% na latência para o primeiro episódio de imobilidade no grupo de animais tratados com uma dose de 250 mg/kg, administrada pela via i.g., quando comparado ao grupo de animais tratados com o veículo. Embora sem diferença estatística significativa, a dose de 500 mg/kg aumentou em aproximadamente 42% a latência para a imobilidade. O tempo total de imobilidade no TSC foi reduzido (em torno de 43%) após a administração do extrato na dose de 500 mg/kg, quando comparado ao grupo de animais controle.

TNF: O tratamento agudo dos animais com uma dose de 500 mg/kg, (i.g.) do extrato aumentou significativamente (em cerca de 50%) a latência para o primeiro episódio de imobilidade no tempo de 120 min, quando comparado ao grupo controle. Por sua vez, tempo total de imobilidade foi reduzido nos tempos de 60 e 120 minutos (24% e 21%). Com relação à curva dose-resposta, a latência para o primeiro episódio de imobilidade foi aumentada em cerca de 41% e 54% nos animais tratados com as doses de 250 mg/kg e 500 mg/kg, respectivamente. O tempo total de imobilidade foi reduzido em torno de 21% após a administração do extrato na dose de 500 mg/kg, quando comparado ao grupo de animais do grupo controle.

TCE: Embora não tenha alterado de modo significativo o número de transições, após 120 minutos de tratamento com a dose de 500 mg/kg houve uma redução de cerca de 30% no tempo total de permanência dos animais no compartimento escuro. A análise estatística demonstrou uma redução que parece ser dose-dependente no tempo gasto no lado escuro do aparato quando os animais tratados com o extrato foram avaliados no TCE. O tratamento dos animais com uma dose de 250 mg/kg reduziu significativamente em cerca de 20% o tempo total de permanência no lado escuro, enquanto que a dose de 500 mg/kg causou uma redução de 37%. O número de transições realizadas pelos grupos tratados com o extrato não foi alterado de modo significativo.

TCA: Em nenhum dos tempos testados o tratamento com a dose 500 mg/kg, administrada pela via i.g., alterou o número total de cruzamentos no teste do campo aberto. Já o parâmetro

utilizado para analisar a atividade exploratória dos animais foi significativamente alterado no tempo de 120 minutos; o tratamento agudo com *Pfaffia glomerata* reduziu em 49% o número total de elevações. As doses de 125 mg/kg e 250 mg/kg não alteraram a atividade locomotora e exploratória dos animais.

Discussão

As plantas do gênero *Pfaffia* são utilizadas popularmente como tônicos gerais, com finalidade de aumentar o estado de ânimo físico e mental. Este uso tradicional levantou, portanto, a hipótese de que poderiam atenuar os sintomas de doenças relacionados ao humor, como depressão e ansiedade. Nesse sentido, este trabalho se dedicou ao estudo dos efeitos da *Pfaffia glomerata*, uma planta nativa do pantanal matogrossense, em modelos experimentais de depressão e ansiedade em roedores. Os resultados deste trabalho demonstram que o extrato hidroetanólico obtido das raízes de *Pfaffia glomerata* possui ações do tipo antidepressiva e ansiolítica em camundongos, sem alterar significativamente a atividade locomotora e exploratória dos animais.

Os TSC e TNF são paradigmas amplamente aceitos no estudo de ações do tipo antidepressivas (Castagne et al., 2011) Estes testes baseiam-se em submeter os animais a situações estressantes e inescapáveis, como a suspensão pela cauda ou o nado forçado, que induzem um comportamento de imobilidade, muitas vezes denominado “desamparo”, que é interpretado como do tipo depressivo. A base neurobiológica para esta associação reside no fato de que a persistência e a intensidade exagerada do estresse, bem como a incapacidade do organismo em terminar sua resposta, levam a uma hiper-reatividade do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) e consequente aumento da liberação de hormônios corticoides, que causam prejuízos potenciais ao organismo e culminam com o desenvolvimento de alterações neuroendócrinas, neuroquímicas e comportamentais (Popoli et al., 2011). Drogas antidepressivas são capazes de inibir o comportamento do tipo depressivo em ambos os testes, reduzindo o tempo total de imobilidade e aumentando a latência para o primeiro episódio de imobilidade (Kang et al, 2010; Saarelainen et al., 2003). A exemplo destas drogas, o extrato obtido das raízes da *Pfaffia glomerata* reduziu o tempo total de imobilidade e aumentou a latência nos TSC e TNF, demonstrando um efeito do tipo antidepressivo desta espécie vegetal.

O paradigma claro-escuro é baseado em uma situação de conflito, que se dá entre a tendência natural dos animais em explorar e a tendência inicial de se esquivar do que não é familiar (ambiente novo) e é aversivo (iluminação). Quando tratados com drogas utilizadas na clínica para o tratamento da ansiedade, como os benzodiazepínicos, os animais acabam passando significativamente mais tempo no compartimento claro do modelo, quando comparados aos animais controles (Crawley e Goodwin, 1981); o parâmetro tempo total no compartimento escuro é considerado um índice forte e reprodutível do nível de ansiedade. Interessantemente, os resultados deste trabalho apontam para uma ação do tipo ansiolítica do extrato obtido das raízes da *Pfaffia glomerata*. O tratamento agudo com este extrato reduziu o tempo total de permanência dos animais no compartimento escuro nas doses de 250 e 500 mg/kg, em comparação ao grupo controle.

Embora os testes TSC, TNF e TCE tenham um importante valor preditivo de ações antidepressivas e ansiolíticas, eles estão sujeitos a interferências que podem levar a uma falsa interpretação. Drogas estimulantes que aumentam a atividade locomotora e exploratória dos animais após um tratamento agudo podem ser encaradas erroneamente como potenciais antidepressivos. Neste trabalho, demonstrou-se que o tratamento com o extrato das raízes da *Pfaffia glomerata* não produziu aumento significativo nos parâmetros relacionados à locomoção e exploração dos animais no teste do campo aberto, podendo-se sugerir que os resultados obtidos nos paradigmas de depressão não são devido a efeitos psicoestimulantes. Surpresamente, nossos resultados

demonstraram uma redução na atividade exploratória dos animais na maior dose testada após 120 minutos de tratamento. Sabe-se que diversos fatores podem alterar o instinto de exploração de roedores frente a um ambiente novo, mas o principal deles é a presença de toxicidade (Souza, et. al 2003). Embora este estudo não tenha se dedicado a investigar os efeitos tóxicos da *Pfaffia glomerata* após o seu tratamento agudo, os resultados podem apontar para um possível efeito tóxico desta espécie vegetal que, de fato, já foi demonstrado (De-Paris et al., 2000).

Conclusão

Com base nos resultados deste trabalho, pode-se sugerir que o extrato hidroalcoólico obtido das raízes de *Pfaffia glomerata* apresenta promissoras propriedades farmacológicas, minimizando os sintomas relacionados à depressão e ansiedade em camundongos. Novos estudos estão sendo realizados a fim de se elucidar os mecanismos envolvidos nestas ações, bem como na investigação da toxicidade desta espécie vegetal.

Referências Bibliográficas

- Birur, B.; Math, S.B.; Fargason, R.E. A Review of Psychopharmacological Interventions Post Disaster to Prevent Psychiatric Sequelae. **2017**, *Psychopharmacol Bull* 26;47(1):8-26.
- Castagne, V.; Moser, P.; Roux, S.; Porsolt, R.D. Rodent models of depression: forced swim and tail suspension behavioral despair tests in rats and mice. **2011**, *Curr Protoc Neurosci.*; 8:8.10A.
- Crawley J, Goodwin FK. Preliminary report of a simple animal behavior model for the anxiolytic effects of benzodiazepines. *Pharmacol Biochem Behav.* 1980
- De-paris, F. et al. Psychopharmacological screening of *Pfaffia glomerata* Spreng.(Amaranthaceae) in rodents. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 73, n. 1, p. 261-269, 2000.
- Freitas CS, Baggio CH, Twardowschy A, dos Santos AC, Mayer B, Luiz AP, dos Santos CA, Marques MC, dos Santos AR. Involvement of glutamate and cytokine pathways on antinociceptive effect of *Pfaffia glomerata* in mice. *J Ethnopharmacol.* 2009 Apr 21;122(3):468-72.
- Hamon M, Blier P. Monoamine neurocircuitry in depression and strategies for new treatments. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2013 Aug 1;45:54-63.
- Kang S, Kim HJ, Kim HJ, Shin SK, Choi SH, Lee MS, et al. Effects of reboxetine and citalopram pretreatment on changes in cocaine and amphetamine regulated transcript (CART) expression in rat brain induced by the forced swimming test. *Eur J Pharmacol.* 2010;647:110-6.
- Marques, L.C; Galvão, sm; Espínola, e; Dias rf; Mattei, r; Oliveira mg; de Araújo Carlini, el Psychopharmacological assessment of *Pfaffia glomerata* roots (extract BNT-08) in rodents. *Phytother Res.* Jul;18(7):566-72. 2004
- Popoli M, Yan Z, McEwen BS, Sanacora G., 2011. The stressed synapse: the impact of stress and glucocorticoids on glutamate transmission. *Nat Rev Neurosci*, 30;13(1):22-37.
- Porsolt, R.D., Le Pichon, M., Jalfre, M., 1977. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature* 266, 730–732.
- Saarelainen T; Hendolin P; Lucas G; Koponen E; Sairanen M; Macdonald E; Agerman K; Haapasalo A; Nawa H; Aloyz R; Ernfors P; Castrén e. Activation of the Trk neurotrophin receptor is induced by antidepressant drugs and is required for antidepressant-induced behavioral effects. *The Journal of Neuroscience* p. 349-357. 2003
- Souza, M.M. Métodos de avaliação de atividade biológica de produtos naturais e sintéticos. In: Bresolin, T.M.B.; Cechinel Filho, V. Ciências químico-farmacêuticas: contribuição ao desenvolvimento de novos fármacos e medicamentos. Itajaí: UNIVALI, 2003, 239p.

- Steru L., Chermat R., et.al. The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. *Psychopharmacol.* n. 85, p. 367-370. 1985.
- Taniguchi, S.F.; Bersani-Amado, C.A.; Sudo, L.S.; Assef, S.M.C.; Oga, S. Effect of *Pfaffia irsinoides* on experimental inflammatory process in rats. *Phytotherapy Research.* v.11, p568-571, 1997.
- Teixeira CG, Piccoli A, Costa P, Soares L, da Silva-Santos JE., Involvement of the nitric oxide/soluble guanylate cyclase pathway in the anti-oedematogenic action of *Pfaffia glomerata* (Spreng) Pedersen in mice. *J Pharm Pharmacol.* 2006 May;58(5):667-75.
- Walsh, R. N.; Cummins, R. A. The open field test: a critical review. *Psychol Bull.* v.83, p. 482-504. 1976.

