



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
FARMACÊUTICAS (PPGCF)

**EFEITOS DO TRATAMENTO SUBCRÔNICO COM FLUOXETINA  
SOBRE OS COMPORTAMENTOS E PARÂMETROS OXIDATIVOS  
DE RATOS SUBMETIDOS AO EXERCÍCIO FÍSICO EXAUSTIVO**

JERUSA DE CARVALHO LEAL

**BELÉM-PA  
2017**



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
FARMACÊUTICAS (PPGCF)

**EFEITOS DO TRATAMENTO SUBCRÔNICO COM FLUOXETINA  
SOBRE OS COMPORTAMENTOS E PARÂMETROS OXIDATIVOS  
DE RATOS SUBMETIDOS AO EXERCÍCIO FÍSICO EXAUSTIVO**

Dissertação de Mestrado apresentado ao Programa de Pós-graduação em Ciências, na área: Fármacos e medicamentos. Linha de Pesquisa: Desenvolvimento e avaliação de medicamentos naturais e sintéticos, do Instituto de Ciências da Saúde, da Universidade Federal do Pará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Marta Chagas Monteiro.  
Co-orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Cristiane do Socorro Ferraz Maia.

**BELÉM-PA**

**2017**

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Jerusa de Carvalho Leal

### EFEITOS DO TRATAMENTO SUBCRÔNICO COM FLUOXETINA SOBRE OS COMPORTAMENTOS E PARÂMETROS OXIDATIVOS DE RATOS SUBMETIDOS AO EXERCÍCIO FÍSICO EXAUSTIVO

Dissertação de Mestrado apresentado ao Programa de Pós-graduação em Ciências, na área: Fármacos e medicamentos. Linha de Pesquisa: Desenvolvimento e avaliação de medicamentos naturais e sintéticos, do Instituto de Ciências da Saúde, da Universidade Federal do Pará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovado em:

Banca Examinadora

O Prof(a). Dr(a).: Marta Chagas Monteiro

Instituição: UFPA Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof(a). Dr(a).: Cristiane do Socorro Ferraz Maia

Instituição: UFPA Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof(a). Dr(a).: Rui Daniel Prediger

Instituição: UFSC Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr.

Instituição: UFPA Assinatura: \_\_\_\_\_

## DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Maria e Jonas, que me ensinaram princípios e valores a serem seguidos e por me apoiarem nas minhas escolhas e decisões, torcendo sempre por mim.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente á Deus, por ter me concedido uma vida de saúde e esperanças, por ter me dado à oportunidade de estar fechando mais um ciclo da minha vida. Por me ouvir nas minhas orações e pedidos de força para continuar quando fraquejei e pensei em desistir.

Depois de Deus, meus agradecimentos são os meus pais Jonas Farache e Maria Benedita, por terem me educado e ensinado o caminho certo a seguir com conselhos e exemplos, mesmo tendo uma escolaridade baixa, me mostraram a importância de estudar e buscar novos conhecimentos. Por me ensinarem não desistir dos meus sonhos e objetivos. Agradeço por estarem, sempre dispostos a me ajudarem e preocupados com meu bem-estar. Sou muito feliz pelo orgulho que meus pais sentem de mim, e diante das dificuldades e obstáculos vencidos, hoje realizo mais um sonho.

Às minhas irmãs e tias, que se sentem orgulhosas de mim, sempre dispostas a me ajudar quando preciso, que torceram, choraram e festejaram comigo, amo vocês.

Ao meu namorado Ronie, por me incentivar, me compreender em momentos que não pude estar e nem conversar com ele, porque estava estudando. Por acreditar que era capaz de terminar mais essa etapa da minha vida.

À prof<sup>a</sup>. Dra Marta Monteiro por ter aceitado ser minha orientadora nesse desafio, sem nem mesmo me conhecer direito. Por me incentivar a continuar quando pensava em desistir por meio de exemplos da sua vida e por palavras que mostravam o quanto sou capaz. Por me ensinar a construir e concretizar meu projeto. Pela compreensão e paciência que teve comigo todo esse tempo, obrigada por tudo professora querida.

À prof<sup>a</sup>. Dra. Cristiane Maia, por ter sido minha co-orientadora e acreditado muito em mim e no meu potencial. Sempre disposta a me auxiliar em tudo que precisei, sempre me incentivando. Agradeço de coração minha querida professora.

Agradeço a equipe do LBEIM, Bruno Quadros que me ajudou muito a realizar os experimentos, mesmo quando estava ocupado com seu projeto, me elogiou, me ensinou e as vezes me chamava atenção quando errava, fatos válidos para meu crescimento. A Carla que foi uma amiga que conquistei para toda vida,

sempre disposta a me ouvir e me ajudar dentro do laboratório. A Priscila que me ajudava durante os experimentos. Agradeço a todos colaboradores do LABEIM, que de forma direta ou indiretamente, me ajudaram durante essa trajetória que passei por lá. Uns com elogios e outros com estupidez, os quais só me engrandeceram como pessoa.

Aos colaboradores do LAFICO, que me acolheram de forma carinhosa e respeitosa, em especial a Diandra que me auxiliou durante experimentos, uma pessoa simples, dedicada, inteligente e sempre solícita, outra amiga que conquistei para vida. Aos ICs Paula e Fábio que estavam comigo durante todos meus experimentos, sábado domingo e feriados. Meninos excelentes e inteligentes com um futuro promissor. Ao Klaylton, aos Brunos, Sabrina, Ademar e todos outros que me ajudaram de alguma forma.

À prof<sup>a</sup>. Dra. Luana Fernandes pelo auxílio nesta etapa final do mestrado, que se dispôs a me ensinar a ANOVA de duas vias, em um momento de desespero pelo qual passei. Também pelas suas considerações na minha qualificação e dicas importantes para finalização do meu trabalho.

Ao prof. Dr. Enéas Fontes pelas considerações relevantes na minha qualificação e para o desenvolvimento da minha dissertação.

Ao prof. Dr. Sandro Percário que abriu as portas do seu laboratório para realizarmos uma etapa importante dos experimentos.

Às secretárias do PPGCF Cliciane e Brasília sempre solícitas, por me auxiliarem em todas as burocracias, sempre tornando tudo mais fácil e rápido.

Ao senhor Amarildo do biotério do ICS, que foi extraordinário me dando prioridade em um momento de escassez de ratos.

A todos os professores do PPGCF/UFGA que de alguma forma contribuíram, por meio de aulas, palestras ou cederam seus laboratórios para realização de experimentos. Obrigada a todos os professores.

À Universidade Federal do Pará, por todo apoio financeiro recebido durante o curso.

## EPÍGRAFE

“Os analfabetos do século 21 não serão aqueles que não sabem ler e escrever, mas aqueles que não sabem aprender, desaprender e reaprender.”

Alvin Toffler

## RESUMO

LEAL, J.C. **Efeitos do tratamento subcrônico com fluoxetina sobre os comportamentos e parâmetros oxidativos de ratos submetidos ao exercício físico exaustivo.** 2017, 109 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Pará, 2017.

A fluoxetina é um fármaco antidepressivo da classe dos inibidores seletivos da recaptação da serotonina, sua utilização pode ser uma alternativa terapêutica na reversão ou redução das alterações causadas pela baixa atividade serotoninérgica. O aumento dos níveis serotoninérgicos também pode ser induzido pelo exercício físico regular, nesse sentido, já são bem relatados os benefícios à saúde e a prevenção de doenças que esse tipo de exercício promove. Entretanto, quando o exercício é praticado exaustivamente pode induzir a aumento do estresse oxidativo e alterações no comportamento emocional em humanos e animais experimentais. Com isso, o objetivo desse trabalho foi avaliar os efeitos do tratamento subcrônico com fluoxetina sobre os comportamentos e parâmetros oxidativos em ratos submetidos ao exercício físico exaustivo no nado forçado. Para isso, ratos machos adultos da linhagem *Wistar* foram divididos em animais sedentários e os expostos ao exercício físico exaustivo que foram tratados subcronicamente com as seguintes substâncias fluoxetina 10mg/Kg/dia (NaCl, 0,9%) e solução salina ambos pela via; i.p por 7 dias. Após 30 minutos da intoxicação os animais foram individualmente expostos ao exercício físico exaustivo durante 20 minutos. No oitavo dia de experimento, foram realizados o teste de campo aberto (TCA) e o labirinto em cruz elevado (LCE) para avaliação da locomoção espontânea e do comportamento semelhante a ansiedade respectivamente. Em seguida, os animais foram autanasiados e foram coletados o sangue, fígado e cérebro para determinação dos níveis de GSH, TEAC, NO e MDA. Os resultados obtidos, os animais tratados com a fluoxetina associado ao exercício físico exaustivo apresentaram redução na locomoção causada pelo estresse emocional no TCA e redução no comportamento semelhante a ansiedade no LCE. Quanto aos parâmetros do estresse oxidativo, a fluoxetina associada à prática de exercício físico exaustivo, de maneira geral, induziu estresse oxidativo no organismo, principalmente no sangue e fígado destes animais, com redução dos níveis de GSH e TEAC e aumento dos níveis de NO e MDA. Por outro lado, no cérebro, o tratamento com fluoxetina mostrou efeito protetor sobre o estresse oxidativo, com redução nos níveis de NO e MDA e aumento em fatores antioxidantes. Diante os dados, conclui-se que a fluoxetina associada ao exercício físico exaustivo apresenta atividade de efeito dual em relação ao comportamento e ao balanço oxidativo, reduzindo a locomoção e aumentando o efeito ansiolítico, demonstrando efeitos antioxidantes ou pró-oxidantes dependendo do tecido ou órgão avaliado.

**Palavras-chave:** Ansiedade; Comportamento; Estresse oxidativo; Exercício físico exaustivo; Fluoxetina; Serotonina.



## ABSTRACT

LEAL, J.C. **Effects of subchronic treatment with fluoxetine on the behavior and oxidative parameters of rats submitted to exhaustive physical exercise.** 2017, 109 f. Dissertation (Master degree) - Faculty of Pharmacy, Federal University of Pará, 2017.

Fluoxetine is an antidepressant drug of the selective serotonin reuptake inhibitor class, its use may be a therapeutic alternative in reversing or reducing the changes caused by low serotonergic activity. The increase in serotonergic levels can also be induced by regular physical exercise, in that sense, the health benefits and the prevention of diseases that this type of exercise are promoted are already well reported. However, when exercise is practiced exhaustively it may induce increased oxidative stress and changes in emotional behavior in humans and experimental animals. Therefore, the objective of this study was to evaluate the effects of subchronic treatment with fluoxetine on the behavior and oxidative parameters in rats submitted to exhaustive physical exercise in forced swimming. Therefore, adult male rats of Wistar strain were divided into sedentary animals and exposed to exhaustive exercise subchronically that were treated with fluoxetine 10 mg / kg / day (NaCl 0.9%) and saline either via i.p. for 7 days. After 30 minutes of intoxication the animals were individually exposed to exhaustive physical exercise for 20 minutes. On the eighth day of the experiment, the open field test (TCA) and the high cross labyrinth (LCE) were performed to evaluate spontaneous locomotion and anxiety - like behavior, respectively. The animals were then euthanized and blood, liver and brain were collected for determination of GSH, TEAC, NO, and MDA levels. The results obtained, the animals treated with fluoxetine associated to exhaustive physical exercise showed reduction in the locomotion caused by the emotional stress in the ACT and reduction in the behavior similar to the anxiety in the LCE. Regarding the parameters of oxidative stress, fluoxetine associated with the practice of exhaustive physical exercise, in general, induced oxidative stress in the organism, mainly in the blood and liver of these animals, with reduction of the levels of GSH and TEAC and increase of levels of NO and MDA. On the other hand, in the brain, treatment with fluoxetine showed protective effect on oxidative stress, with reduction in NO and MDA levels and increase in antioxidant factors. On the data, it is concluded that fluoxetine associated with exhaustive exercise has dual effect of activity in relation to neurobehavioral and oxidative balance, reducing movement and increasing the anxiolytic effect, demonstrating antioxidant or pro-oxidant depending on the tissue or organ evaluated.

**Key words:** Anxiety; Behavior; Oxidative stress; Exhaustive physical exercise; Fluoxetine; Serotonin.

## LISTA DE ILUSTRAÇÃO

|  |    |
|--|----|
| Figura 1. Síntese da serotonina .....  | 11 |
| Figura 2. Esquema da neurotransmissão serotoninérgica .....  | 13 |
| Figura 3. Esquema dos ISRS inibindo a recaptção da serotonina. ....  | 15 |
| Figura 4. Mecanismo de ação da fluoxetina .....  | 17 |
| Figura 5. Etapas da Peroxidação lipídica .....   | 23 |
| Figura 6. Processos para a realização do exercício físico exaustivo. ....  | 33 |
| Figura 7. Prática de exercício físico (nado forçado). ....   | 33 |
| Figura 8. Aparato do teste de campo aberto .....   | 35 |
| Figura 9. Aparato do labirinto em cruz elevado .....   | 36 |
| Figura 10. Esquema da técnica para a realização da determinação do NO. ....  | 38 |
| Figura 11. Esquema demonstrando os procedimentos para determinação da GSH intracelular.....  | 40 |
| Figura 12. Efeito do tratamento subcrônico com fluoxetina em ratos adultos sedentários e submetidos ao exercício físico exaustivo sobre a locomoção espontânea no teste de campo aberto..... | 46 |
| Figura 13. Efeito do tratamento subcrônico com fluoxetina em ratos adultos sedentários e submetidos ao exercício físico exaustivo no teste do labirinto em cruz elevado.....                 | 48 |
| Figura 14. Efeito do tratamento subcrônico com fluoxetina em ratos adultos sedentários e submetidos ao exercício físico exaustivo na produção de GSH. ....                                   | 50 |
| Figura 15. Efeito do tratamento subcrônico com fluoxetina em ratos adultos sedentários e submetidos ao exercício físico exaustivo na produção do TEAC....                                    | 52 |
| Figura 16. Efeito do tratamento subcrônico com fluoxetina em ratos adultos sedentários e submetidos ao exercício físico exaustivo na produção do NO.....                                     | 54 |
| Figura 17. Efeito do tratamento subcrônico com fluoxetina em ratos adultos sedentários e submetidos ao exercício físico exaustivo na produção do MDA. ....                                   | 56 |

## LISTA DE TABELAS E QUADROS

|   |    |
|---|----|
| Quando 1: Principais localizações e funções dos receptores 5-HT <sub>1-4</sub> .....          | 12 |
| Quadro 2: Características físico-químicas da fluoxetina.....                                  | 16 |
| Quadro 3: Principais características farmacocinéticas da fluoxetina.....                      | 19 |
| Quadro 4: Principais características das espécies reativas formadas no organismo<br>.....     | 22 |
| Quadro 5: Materiais utilizados no tratamento farmacológico.....                               | 30 |
| Quadro 6: Grupos experimentais, descrição do tratamento e número de animais<br>por grupo..... | 30 |
| Quadro 7: Cronograma dos grupos e atividades durante os experimentos.....                     | 32 |

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

|                               |  |
|-------------------------------|--|
| 5-HT                          | Serotonina   |
| 5-HIAA                        | Acido 5-hidroxi-indol-acético  |
| ABTS                          | Radical 2,2-azinobis [3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato], sal de diamônio |
| ATP                           | Adenosina trifosfato   |
| ATP-CP                        | Sistema fosfagênio de creatina   |
| BDNF                          | Fator neurotrófico derivado do cérebro                                   |
| CAT                           | Catalase   |
| CEUA                          | Comissão de Ética no uso de Animais                                      |
| CK                            | Creatina quinase   |
| C-NOS                         | Óxido nítrico síntese constitutiva                                       |
| CSD                           | Depressão de espalhamento cortical                                       |
| CYP                           | Citocromo P450   |
| DSM-IV                        | Manual de Estatística e Diagnóstico das Desordens Mentais                |
| DTNB                          | Ácido-5,5-ditiobis-2-nitrobenzóico                                       |
| DNA                           | Ácido desoxirribonucleico  |
| EDTA                          | Ácido Etilenodiamino tetra-Acético                                       |
| ERNs                          | Espécies reativas de nitrogênio  |
| EROs                          | Espécies Reativas de Oxigênio  |
| FDA                           | <i>US Food and Drug Administration</i>                                   |
| GSH                           | Glutaciona Reduzida  |
| Gpx                           | Glutaciona Peroxidase  |
| H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> | Peróxido de hidrogênio   |
| HPA                           | Hipotálamo-hipófise-adrenal  |
| IL-6                          | interleucina-6   |

|                             |   |
|-----------------------------|---|
| I-NOS                       | Óxido nítrico síntese induzível                     |
| ISRS                        | Inibidores seletivos da recaptação da serotonina    |
| LDH                         | Desidrogenase láctica                               |
| MAO                         | Monoaminoxidase                                     |
| MCPAd                       | Matéria cinzenta periaquedutal dorsal               |
| MDA                         | Malondialdeído                                      |
| NaCl                        | Cloreto de Sódio                                    |
| NADPH                       | Fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida  |
| NE                          | Norepinefrina                                       |
| NDR                         | Núcleo dorsal da rafe                               |
| NO                          | Óxido nítrico                                       |
| NOS                         | Óxido nítrico síntese                               |
| O <sub>2</sub> <sup>•</sup> | Ânion superóxido                                    |
| •OH                         | Radical hidroxil                                    |
| ONOO <sup>-</sup>           | Peroxinitrito                                       |
| PBS                         | Tampão fosfato-salino                               |
| ROH                         | Radical peroxil                                     |
| SNC                         | Sistema Nervoso Central                             |
| SOD                         | Superóxido dismutase                                |
| TCA                         | Teste do campo aberto                               |
| TEAC                        | Capacidade antioxidante total equivalente ao Trolox |
| TGI                         | Trato gastrointestinal                              |
| TNB                         | Ácido nitrobenzóico                                 |
| TNF                         | Teste de Nado forçado                               |
| TOC                         | Transtorno obsessivo compulsivo                     |
| TPH                         | Triptofano hidroxilase                              |

## SUMÁRIO

|       |  |    |
|-------|--|----|
| 1.    | INTRODUÇÃO.....  | 8  |
| 2.    | REFERENCIAL TEÓRICO .....  | 9  |
| 2.1   | Exercício físico: características gerais.....                              | 9  |
| 2.2   | Serotonina ou 5-hidroxitriptamina (5-HT).....                              | 10 |
| 2.2.1 | Ansiedade.....   | 13 |
| 2.3   | Fluoxetina .....   | 15 |
| 2.3.1 | Mecanismo de ação.....   | 16 |
| 2.3.2 | Farmacocinética .....  | 18 |
| 2.4   | Estresse oxidativo .....   | 19 |
| 2.4.1 | Espécies reativas de oxigênio (EROS) e nitrogênio (ERNs) e radicais livres | 20 |
| 2.4   | Peroxidação Lipídica .....   | 22 |
| 2.6   | Sistema de defesa Antioxidante .....                                       | 24 |
| 2.7   | A interação do exercício físico, fluoxetina e o estresse oxidativo .....   | 25 |
| 3.    | Objetivo geral .....   | 28 |
| 3.1   | Objetivos específicos.....   | 28 |
| 4.    | MATERIAIS E MÉTODOS.....   | 29 |
| 4.1   | Animais de experimentação .....  | 29 |
| 4.2   | Obtenção da fluoxetina e via de administração .....                        | 29 |
| 4.3   | Grupos experimentais.....  | 30 |
| 4.4   | Tratamento farmacológico .....   | 31 |
| 4.5   | Exercício físico.....  | 32 |
| 4.6   | Testes comportamentais .....   | 34 |
| 4.6.1 | Teste do Campo Aberto ( <i>open field</i> ).....                           | 34 |
| 4.6.2 | Teste do Labirinto em Cruz Elevado (LCE) .....                             | 35 |
| 4.7   | Coleta de sangue e órgãos dos animais.....                                 | 36 |

|       |   |    |
|-------|---|----|
| 4.8   | Determinação dos parâmetros de estresse oxidativos .....  | 37 |
| 4.8.1 | Dosagem do oxido nítrico .....  | 37 |
| 4.8.2 | Avaliação da capacidade antioxidante total equivalente ao Trolox (TEAC).38                          |    |
| 4.8.3 | Determinação da atividade da Glutaciona .....   | 40 |
| 4.8.4 | Dosagem de Malondialdeido (MDA) .....   | 41 |
| 4.9   | Organograma dos experimentos .....  | 42 |
| 4.10  | Análise estatística .....   | 44 |
| 5.    | RESULTADOS .....  | 45 |
| 5.1   | Testes comportamentais .....  | 45 |
| 5.1.1 | Teste de campo aberto .....   | 45 |
| 5.1.2 | Teste do labirinto em cruz elevado .....  | 47 |
| 5.2   | Parâmetros oxidativos .....   | 49 |
| 5.2.1 | Avaliação dos níveis de glutaciona (GSH) no sangue, cérebro e fígado.....                           | 49 |
| 5.2.2 | Avaliação da capacidade de antioxidante total pelo método de TEAC no sangue, cérebro e fígado ..... | 51 |
| 5.2.3 | Avaliação dos níveis de oxido nítrico (NO) no sangue, cérebro e fígado .....                        | 53 |
| 5.2.4 | Avaliação dos níveis malonaldeído (MDA) no sangue, cérebro e fígado.....                            | 55 |
| 6.    | DISCUSSÃO .....   | 57 |
| 7.    | CONCLUSÃO .....   | 72 |
| 8.    | PRINCIPAIS REFERÊNCIAS .....  | 73 |

## 1. INTRODUÇÃO

A fluoxetina é um fármaco antidepressivo pertencente à classe dos inibidores seletivos da recaptção da serotonina (ISRS). Na década 70, Wong et al. (1974) demonstraram que este fármaco apresentava um grande potencial no tratamento da depressão, agindo especificamente sobre o mecanismo dependente da serotonina, por meio da inibição da sua proteína de recaptção (WONG et al. 2005; JACOBSEN et al. 2012). A redução nos níveis deste neurotransmissor do sistema nervoso central (SNC) parece está associado a alterações comportamentos, incluindo comportamento sexual, alimentação, regulação do peso corporal, ansiedade e entre outros (CIRANNA e CATANIA, 2014).

O aumento dos níveis da serotonina eleva suas ações em diversos receptores serotoninérgico nas regiões do SNC. Sendo assim, a fluoxetina vem sendo utilizada como alternativa terapêutica que pode reverter ou reduzir alterações causadas pela baixa atividade serotoninérgica (WONG et al. 2005). Além da utilização de medicamentos, o exercício físico regular também é considerado um indutor do aumento dos níveis serotoninérgicos (BECKMAN e SANTOS, 2013). Os benefícios à saúde e a prevenção de doenças que o exercício físico regular promovidos, já são bem relatados, entretanto, quando praticado exaustivamente, induz o aumento da produção de radicais livres, em razão ao consumo elevado de oxigênio, resultante da demanda energética, promovendo assim, o estresse oxidativo (SASTRE et al. 1992).

Portanto, tanto o exercício físico quanto o tratamento com a fluoxetina são capazes de ativar o sistema serotoninérgico. Alguns estudos mostraram que a fluoxetina é um forte indutor do estresse oxidativo, assim como outros estudos a relacionam a sua ação antioxidante (KHANZODE et al. 2003; ZAFIR et al. 2009; AHMAD et al. 2010; MORETTI et al. 2012; STEPNIAK, 2011). Desta forma, há necessidade da investigação da interação dos efeitos da fluoxetina associada ao exercício físico exaustivo sobre a atividade locomotora espontânea, o comportamento semelhante à ansiedade e no balanço oxidativo em modelo animal.



## 2. REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Exercício físico: características gerais

O exercício físico é conceituado como toda atividade física planejada, estruturada e repetitiva (CASPERSEN et al. 1985). Durante sua execução, normalmente, ocorrem três sistemas de transferência de energia, tais como: o sistema fosfogênio de creatina (ATP-CP), o sistema glicolítico ou do ácido láctico e o aeróbico (MCARDLE et al. 2008). A prática do exercício físico é uma condição que leva a um aumento das exigências de diversos sistemas orgânicos, ativando mecanismos de mobilização de substratos energéticos. Nessa situação, o organismo passa a se adaptar a estímulos, fisiológicos, morfológicos e funcionais. O desempenho desta prática está associado com biosistemas transformadores de energia química em energia mecânica e com a síntese de ATP (adenosina trifosfato) nos músculos esqueléticos por vias aeróbicas, láctica e glicolítica (KORZENIEWSKI e ZOLADZ, 2006).

Existem três tipos de vias de ressíntese de ATP, tais como: anaeróbica que pode ser aláctica (ausência de ácido láctico como produto final), que ocorre quando o exercício físico é praticado rapidamente, esta via sofre a hidrólise da creatina-fosfato, cuja quebra de ligações libera energia gerada pela fragmentação dos fosfatos armazenados nos músculos, que é utilizada na contração muscular (MCARDLE et al. 2008). À medida que o exercício físico continua a maior parte da energia ainda é gerada através das vias anaeróbicas, no sistema de energia em curto prazo. A segunda via de ressíntese é anaeróbica láctica, neste sistema ocorre a glicólise com formação subsequente de ácido láctico (CHAMPE et al. 2006). Com aumento do tempo de exercício, a demanda energética é gerada pela terceira via, a aeróbica que envolve a via glicolítica, formando ácido pirúvico que passa pela mitocôndria, ciclo de Krebs e cadeia respiratória (CHAMPE et al. 2006; PEREIRA et al. 2004). Durante a prática de exercício físico, essas três vias são estimuladas simultaneamente e a intensidade e duração do exercício define qual das vias terá maior participação no processo (MCARDLE et al. 2008).

O exercício físico quando praticado regularmente apresenta efeitos benéficos em relação à saúde, tais como: estimulação do sistema imunológico; ação direta no gasto calórico e na manutenção do metabolismo; na perda de peso, além de retardar o envelhecimento e prevenir o desenvolvimento de doenças crônicas degenerativas, que podem ser causadas pelo sedentarismo (MOTA, 2010; SILVA, ET AL. 2010). Além disso, esta prática apresenta ação no SNC através da manutenção da integridade cerebral, produzindo angiogênese e aumentando a densidade das conexões dendríticas (PYSH e WEISS, 1979; GAO et al. 2014; JACOTTESIMANCAS et al. 2015), assim como melhora o aprendizado e memória (RADAK et al. 2001).

Por outro lado estudos relatam que a prática de exercício exaustivo provoca o estresse oxidativo em animais e humanos, possivelmente relacionado com aumento do consumo de oxigênio e do metabolismo das mitocôndrias, induzindo assim, a elevação da produção de radicais livres provocando fadiga e lesões teciduais. Os possíveis fatores relacionados com aumento da peroxidação lipídica, causados pelo exercício são intensidade, nível de aptidão física, antioxidante, o tecido e alimentação (MIYAZAKI, et al. 2001). Nesse contexto, a prática de exercício físico também pode atuar favoravelmente no sistema serotoninérgico (WANG et al. 2013), pois há relatos de que aumento da serotonina no SNC pode ser utilizado como terapia em algumas condições patológicas como, depressão, ansiedade e aumento da saciedade em humanos e ratos (LESCH, BENGEL et al. 1996).

## **2.2 Serotonina ou 5-hidroxitriptamina (5-HT)**

A serotonina ou 5-hidroxitriptamina (5-HT) é um neurotransmissor conhecido desde 1930 descrito por Erspamer, que começou a estudar a distribuição de um tipo celular chamado células enterocromafins, que se coravam com reagente para indóis. Durante esse estudo, mostrou-se que as maiores concentrações dessa substância se encontravam na mucosa gastrointestinal, em seguida nas plaquetas e menor quantidade no SNC (ERSPAMER, 1986).

A 5-HT é uma monoamina e bioquimicamente pode ser sintetizada por duas etapas a partir do aminoácido essencial triptofano. A primeira etapa da síntese pode ser realizada por duas enzimas diferentes a triptofano-hidroxilase (TPH) 1 e 2. A enzima TPH1 é encontrada na glândula pineal e nas células enterocromafins do intestino que é responsável por sintetizar a maior parte da serotonina encontrada no organismo (COTE et al. 2007). A TPH<sub>2</sub> é limitada aos neurônios do sistema nervoso entérico e aos neurônios do SNC que estão presente em nove núcleos situados nas regiões da linha média (rafe) da ponte e no tronco cerebral superior (ERSPAMER, 1954; HOYER et al. 2002). Na primeira etapa da síntese, o aminoácido triptofano é hidroxilado pela enzima TPH<sub>1</sub> ou TPH<sub>2</sub> produzindo o produto 5-hidroxitriptofano (5-HTT). Em seguida, o 5-hidroxitriptofano é descarboxilado pela triptofano descarboxilase formando a serotonina (figura 1) (CLARK et al. 1954).

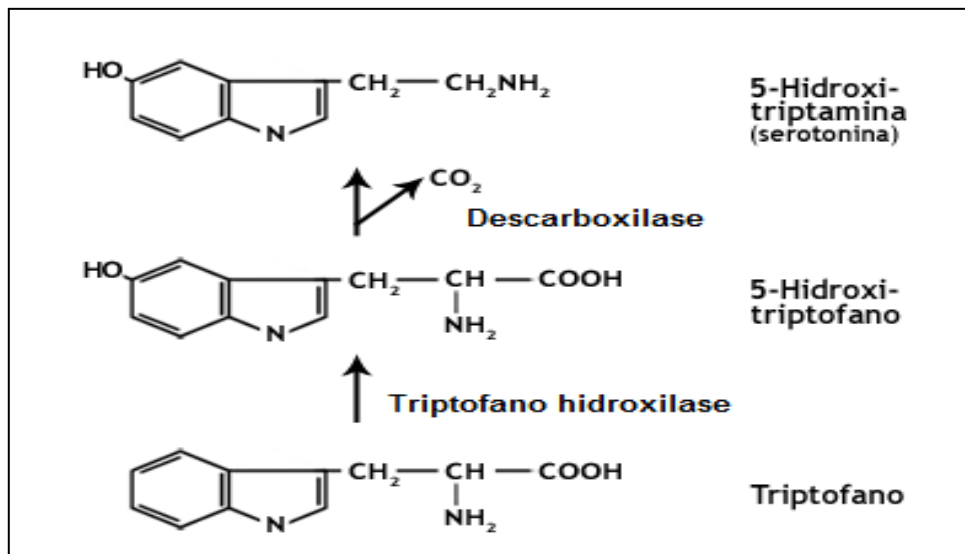


Figura 1. Síntese da serotonina: Triptofano-(Hidroxilase-triptofano)-5-Hidroxitriptofano (5-HTT) -(Descarboxilase) -5-Hidroxitriptamina (Serotonina).

Fonte: COELHO et al. (2013).

Após sua síntese, a serotonina é armazenada em vesícula nos locais de sua produção e a liberação ocorre por meio de estímulos como, impulsos nervosos (figura 2). As diversas ações desse neurotransmissor estão relacionadas com sua interação com diferentes subtipos de receptores, pois estes subtipos apresentam

distribuições específica no SNC e medeiam diversos efeitos comportamentais (PAZOS et al. 1985; WHITAKER-AZMITIA et al. 1990).

Os subtipos de receptores são classificados de acordo com suas propriedades farmacológicas (HOYER e CLARKE et al. 1994). Os receptores são denominados de 5-HT<sub>1</sub> a 5-HT<sub>7</sub> e são divididos em 14 subfamílias diferentes. Dos 7 receptores conhecidos nos dias atuais, apenas os 5-HT<sub>1-4</sub> possuem suas funções definidas (quadro 01). Os tipos e subtipos de receptores da 5-HT estão acoplados a diferentes mecanismos de sinalização. O 5-HT<sub>1</sub>, 5-HT<sub>2</sub> e 5-HT<sub>4-7</sub> são membros da família de receptores acoplados a proteína G, também chamados de metabotrópicos. Enquanto o receptor 5-HT<sub>3</sub> é ionotrópico, sendo capaz de atuar como canal iônico mediado por ligantes, controlando o Na<sup>+</sup> e o K<sup>+</sup> (HOYER e CLARKE et al. 1994; HOYER e HANNON et al. 2002).

Quadro 1- Principais localizações e funções dos receptores 5-HT<sub>1-4</sub>

| <b>Receptores</b> | <b>Localização</b>                       | <b>Principais funções</b>   |
|-------------------|--|---|
| 5-HT <sub>1</sub> | Córtex, hipocampo e amígdala             | Autorreceptor, vasoconstritor e comportamentos (fome, sono, ansiedade); |
| 5-HT <sub>2</sub> | Sangue, estômagos, hipocampo e intestino | Aglutinação, contração e excitação;                                     |
| 5-HT <sub>3</sub> | Centro emético e nervos entéricos        | Excitação neuronal e êmese;   |
| 5-HT <sub>4</sub> | SNC e músculo liso                       | Excitação do trato gastrointestinal.                                    |

Fonte: HOYER e CLARKE et al. 1994; HOYER e HANNON et al. 2002.

As ações da 5-HT podem ser encerradas por sua recaptura da fenda sináptica pelas proteínas transportadoras localizadas na membrana de neurônios pré-sinápticos, (WONG E BYMASTER, 1995). Após a sua recaptação, ocorre a degradação por meio da desaminação oxidativa pela enzima monoaminoxidase (MAO), que está localizada na membrana das mitocôndrias. Existem dois tipos de MAO (A e B), a MAO-A que metaboliza preferencialmente a 5-HT e a NE (norepinefrina) encefálica, a MAO-B que tem ação sobre a 5-HT periférica (plaquetas, células enterocromafins) (SANDLER et al. 1981).

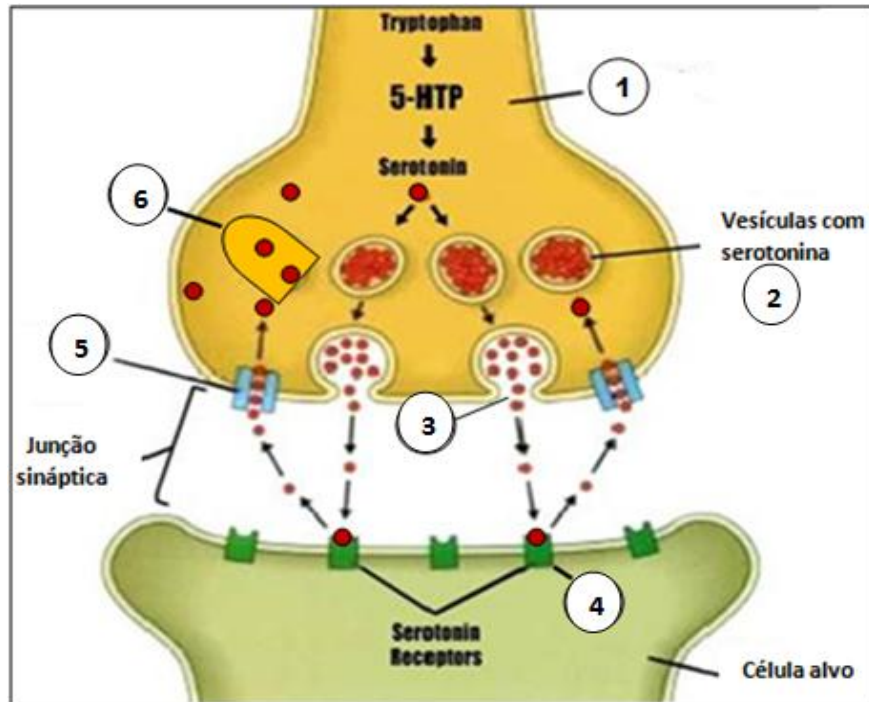


Figura 2. Esquema da neurotransmissão serotonérgica. 1- Síntese da 5-HT a partir do triptofano; 2- Armazenamento da 5-HT em vesículas; 3- Junção das vesículas e liberação da 5-HT pelos neurônios pré-sinápticos; 4- Ação da 5-HT sobre seus receptores; 5- Recaptação da 5-HT bomba de recaptação; 6- Degradação da 5-HT pela enzima MAO.

Fonte: Google imagem. Disponível em:

[http://www.completehealthdallas.com/sitebuilder/images/serotonin\\_in\\_synapse2\\_602x597.jpg](http://www.completehealthdallas.com/sitebuilder/images/serotonin_in_synapse2_602x597.jpg)

A baixa concentração da 5-HT no SNC parece estar associada ao funcionamento inadequado do sistema motor (HARRIS-WARRICK e COHEN 1985), dos ciclos de sono e vigília (STRECKER e THAKKAR et al. 1999), a regulação do apetite, do peso corporal e da temperatura (HALFORD e BLUNDELL 1996). Além disso, pode levar a vários comportamentos envolvendo agressividade (ARANGO e HUANG et al. 2003), transtornos afetivos, transtorno obsessivo compulsivo (TOC), problemas de locomoção, alcoolismo, depressão e ansiedade (LESCH et al. 1996; AKIMOVA et al. 2009).

### 2.2.1 Ansiedade

A ansiedade é considerada um estado emocional transitório representando a resposta a percepção de uma situação ameaçadora, constituída por elementos emocionais/comportamentais e fisiológicos. No contexto emocional, o indivíduo pode

apresentar sensação de medo, insegurança, aumento na resposta de vigília ou alerta (NUTT, 1990). Em relação ao fisiológico, este processo é uma condição do funcionamento cerebral em que acontece ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA), gerando sintomas neurovegetativos tais como: insônia, taquicardia, palidez, aumento da respiração, tensão muscular, tremor, tontura e desordens intestinais (MACKENZIE, 1989; GIUNTINI, 2006). As disfunções da ansiedade podem ocorrer tanto em situações normais quanto em processos patológicos (NUTT, 1984; PRATT, 1992).

Diversas vias de neurotransmissão estão envolvidas no mecanismo de mediação da ansiedade, principalmente os sistemas serotoninérgico e gabaérgico, assim como os dopamínicos e neuropeptídicos (BERNIK, 1999; GRAEFF e GUIMARÃES, 2000). A ação do GABA na ansiedade é sustentado em razão da eficácia dos benzodiazepínicos na diminuição da mesma, comprovado a partir do estudo dos mecanismos de ação dos benzodiazepínicos, em 1960 (SILVA, 2001). O GABA por ser um neurotransmissor encontrado em todo o SNC desempenha ação inibitória sobre neurônios serotoninérgicos dos núcleos dorsais da rafe, na MCPAd (matéria cinzenta periaquedutal dorsal) e no sistema extrapiramidal, garantido assim, a ação moderada do SNC (GORENSTEIN e POMPEIA, 1999).

A serotonina exerce uma função complexa e pouco elucidada na ansiedade, contudo, é considerada fundamental, exercendo ação tanto estimulatória quanto inibitória (GRAEFF e HETEM 2004). Com isso, o papel da serotonina na ansiedade parece ser dúbio, entretanto em sinais de perigo estimulam o sistema de defesa por meio da amígdala e ativam neurônios serotoninérgicos situados nos núcleos dorsais da rafe que se projetam à amígdala e MCPAd (GRAEFF, 2001). Sendo assim, é de grande importância avaliar os efeitos comportamentais de fármacos como a fluoxetina, que podem reverter ou reduzir a ansiedade (HAMON E BOURGOIN 2006; RACAGNI e POPOLI, 2010).

### 2.3 Fluoxetina

A fluoxetina faz parte dos ISRS (figura 3) e foi descrita pela primeira vez por Eli Lilly na forma de cloridrato (WONG et al. 1974), quando surgiu a hipótese de que o aumento da 5-HT era fundamental no tratamento da depressão. Então a partir do ano de 1972, foi identificada e denominada de fluoxetina (WONG et al. 1995). Em 1987, o *US Food and Drug Administration* (FDA) aprovou com o nome comercial Prozac, em 1994 aceitou outros usos clínicos como: no tratamento de TOC e de bulimia nervosa (WONG et al. 1995). As suas principais indicações são: tratamento da depressão associada ou não à ansiedade, bulimia nervosa, TOC e transtorno disfórico pré-menstrual (TDPM), incluindo tensão pré-menstrual (TPM), irritabilidade e disforia (mal-estar provocado pela ansiedade) HAMON E BOURGOIN 2006; RACAGNI e POPOLI, 2010).

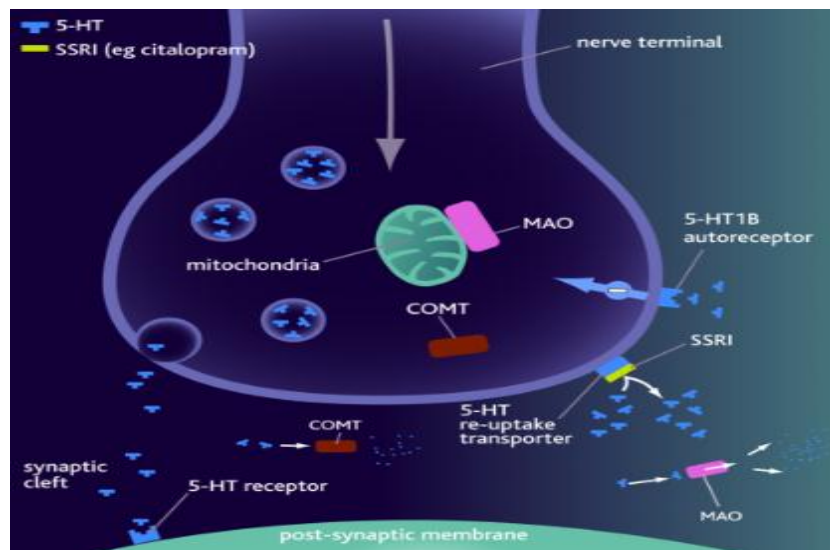
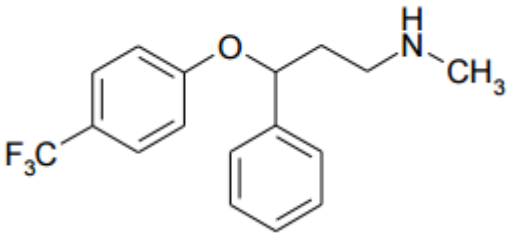


Figura 3. Esquema dos ISRS inibindo a recaptação da serotonina.  
Fonte: Google imagem. Disponível em: <http://knowmental.com/neurotransmitters/>

Atualmente, a fluoxetina possui duas formas farmacêuticas, a cápsula e a solução, ambas administradas por via oral. As dosagens seguras e recomendadas pela empresa farmacêutica Eli Lilly são: Depressão e TDPM de 20 mg/dia; Bulimia Nervosa 60 mg/dia e TOC 20 mg/dia a 60 mg/dia (MERGEL, 2011). A fluoxetina é sintetizada e comercializada como cloridrato de fluoxetina, que é uma mistura racêmica de enantiômeros *R*- e *S*- em quantidades iguais, e ambos apresentam

atividade biológica. A R-fluoxetina apresenta um menor risco de efeitos adversos e de interações entre fármacos e a S-fluoxetina é eliminado mais lentamente, sendo que seu metabolito mais ativo é norfluoxetina (OWENS et al. 2001).

Quadro 2 – Características físico-química da fluoxetina

|                     |   |
|---------------------|---|
| Nome IUPAC:         | N-metil-3-fenil-3-[4-(trifluorometil)fenoxi]propano-1-amina   |
| Formula molecular:  | C <sub>17</sub> H <sub>18</sub> F <sub>3</sub> NO   |
| Formula estrutural: |                   |
| Peso molecular:     | 309.32613g/mol  |
| Cor e forma:        | Pó branco cristalino ou quase branco  |
| Ponto de fusão:     | 158,4 °C e 158,9 °C   |
| Solubilidade        | Ligeiramente solúvel em água, facilmente solúvel em etanol, praticamente insolúvel em éter etílico. |

Fonte: OWENS et al. 2001; FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010.

### 2.3.1 Mecanismo de ação

O mecanismo de ação da fluoxetina ocorre por meio da inibição da proteína SERT (transportador de serotonina neuronal) (figura 4 B), também conhecida como bomba de recaptação cíclica. Esta proteína transporta 5-HT de volta para os neurônios serotoninérgico pré-sinápticos após a liberação desse neurotransmissor (figura 4 A) (HIEMKE e HARTTER 2000; QU et al. 2009). Com isso, a fluoxetina inibe o processo de recaptação da 5-HT, que eleva o nível de serotonina nas fendas sináptica (GOODNICK e GOLDSTEIN, 1998). Desta forma, a maior disponibilidade e quantidade de serotonina nas sinapses estimulam a ação de subtipos de receptores



pós-sinápticos da 5-HT, assim como receptores dos terminais somatodendrítico e pré-sinápticos que regulam atividades serotoninérgicas e a liberação de serotonina (GOODNICK e GOLDSTEIN, 1998).

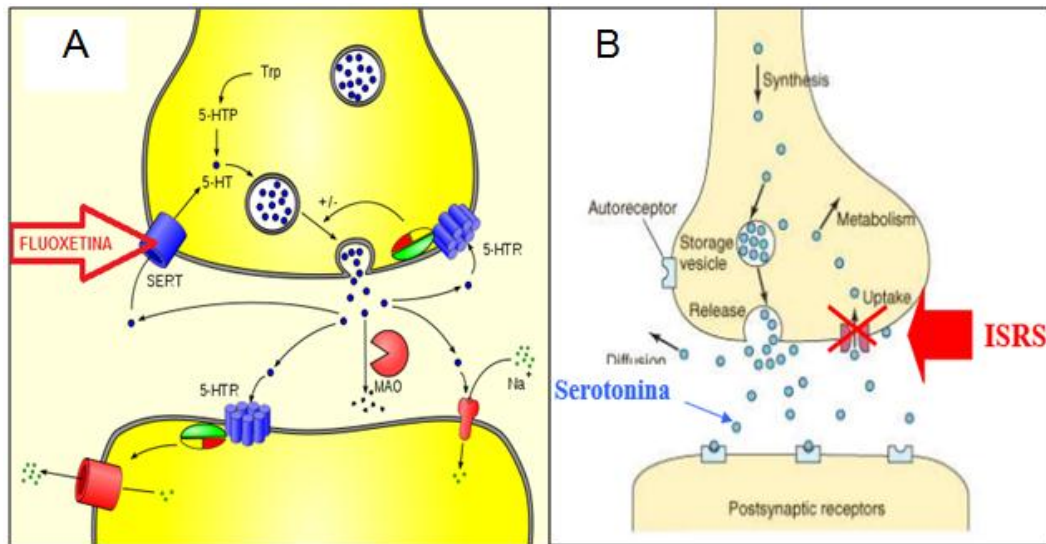


Figura 4. Mecanismo de ação da fluoxetina. Painel A. mostra o local de ação da fluoxetina e a síntese, liberação, bloqueio, recaptação e degradação na fenda sináptica entre dois neurônios. Painel B mostra bloqueio da proteína SERT responsável pela recaptação da serotonina. Triptofano (TRP), serotonina (5-HTP), receptores de serotonina (5-HTR), transportador de serotonina (SERT) monoamina oxidase (MAO).

Fonte: MINNEMAN, (2006);

Google imagem. Disponível em: [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:5-HT\\_Neuron.svg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:5-HT_Neuron.svg)

Parte desse aumento da 5-HT pode ser benéfica para o organismo e responsável por várias ações terapêuticas, inclusive no tratamento da depressão, visto que as atividades do  $5H_{1A}$  podem controlar as saídas de 5-HT de cada via serotoninérgica (NEMEROFF e WENS, 2009; AKIMOVA et al. 2009). Este subtipo de receptor também está envolvido na regulação da temperatura, do humor e da ansiedade (PAZOS e PALÁCIOS, 1985). Por outro lado, a fluoxetina também pode provocar o aumento dos níveis de 5-HT em outras vias, em especial nos receptores  $5-HT_{2A/2C}$  e  $5-HT_3$ , causando efeitos secundários indesejáveis, tais como aumento da ansiedade e alterações no sono.

Segundo Stephen (1997), o receptor  $5HT_{2A}$  pode ser responsável por outras vias serotoninérgicas, como no centro do sono na base do cérebro, provocando assim alterações com interrupção abruptas nas ondas lentas do sono e aumento de despertares noturnos e sonolência durante o dia. Os  $5-HT_{2A}$  que são projetados da

rafe para o centro dos gânglios, geram acatisia, que é o aumento da agitação e alteração motora (STEPHEN, 1997; ZHENG, 2009). Os neurônios serotoninérgicos da rafe se projetam para a medula espinhal que interagem com receptores 5-TH<sub>2C</sub> e neurônios que regulam a função sexual (SCHREIBER e DE VRY, 1993). Quando a 5-HT está aumentada nessa via pode provocar disfunção sexual como retardo na ejaculação e no orgasmo. O 5-TH<sub>2C</sub> também parece estar relacionado com o comportamento alimentar e o humor (HEISLER et al. 2002).

Sintomas gastrointestinais também fazem parte dos efeitos secundários da fluoxetina, mediado pelo aumento da 5-HT no centro do vômito, na base do cérebro e na via serotoninérgica, sendo que a sua projeção para a rafe e hipotálamo pode mediar perda de apetite, provocar náusea e até vômitos (GRAEF, 1993). A ativação dos receptores 5-HT<sub>3</sub> desencadeia uma despolarização rapidamente dessensibilizante, mediada pela regulação de cátions. Esses receptores se localizam nas terminações parassimpáticas do TGI (trato gastrointestinal) podendo provocar diarreia e cólicas quando são ativados (HEISLER et al. 2002; STEPHEN, 1997).

### **2.3.2 Farmacocinética**

A fluoxetina é altamente seletiva provocando poucos efeitos adversos quando comparada com a classe dos medicamentos tricíclicos. Este fármaco é bem absorvido oralmente e sofre um menor efeito do metabolismo de primeira passagem, assim como maior tolerabilidade. As concentrações máximas no plasma ocorrem depois de aproximadamente 6 a 8 horas de uma dose inicial, (ALTAMURA, et al. 1994). Este medicamento possui caráter lipofílico, é um potente inibidor proteico, se liga fortemente a 94% de proteínas plasmáticas. Além disso, tem ampla distribuição e são capazes de deslocar outros fármacos (EMSLIE e JUDGE, 2000).

De maneira geral, a fluoxetina reduz seu metabolismo por ação inibitória dose-dependente das isoenzimas do citocromo P450 (FULLER e WONG, 1987), o que pode necessitar do aumento da dose administrada, assim, como na meia-vida e efeitos colaterais (KIM et al. 2003). Nesse sentido, este fármaco é metabolizado no fígado por várias enzimas da CYP450 e inibe CYP2D6 e 2C9 acentuadamente,

2C19 de forma moderada e 3A4 de forma leve. Sua molécula original é convertida pela CYP2D6 em um metabolito mais ativo chamado norfluoxetina, que é mais potente do que a fluoxetina na inibição de 2C19, 2D6 (TRELUYER e JACQZ-AIGRAIN et al. 1991).

A fluoxetina possui um tempo de meia vida plasmática de aproximadamente 53 horas e seu metabolito norfluoxetina de 240 horas, ambos são seletivos da serotonina. Aproximadamente 2,5% da excreção da fluoxetina e dos seus metabolitos ocorrem pela via renal (urina), sendo que menos de 10% da fluoxetina não metabolizada (HIEMKE e HARTTER, 2000).

Quadro 3 – Principais características farmacocinéticas da fluoxetina

| Parâmetros                  | Fluoxetina  |
|-----------------------------|---|
| Absorção                    | Bem absorvida oralmente                             |
| Biodisponibilidade absoluta | Não conhecido, porém absorção $\geq 80\%$ da dose   |
| Ligação plasmática          | 94%   |
| Depuração mL/min/Kg         | 9,6 $\pm$ 6,9                                       |
| Tempo p/ conc. máxima       | Entre 6 a 8 horas                                   |
| Concentração máxima         | 200-531 ng/mL                                       |
| Estado equilíbrio           | Alcançado após doses continua em 4 a 6 semanas      |
| Biotransformação            | Metabolizada no fígado em norfluoxetina             |
| 1/2 de eliminação (dias)    | Fluoxetina entre 4 a 6 e norfluoxetina entre 4 a 16 |
| Excreção urinária           | < 2,5%  |

Fonte: HIEMKE e HARTTER, 2000; TRELUYER e JACQZ-AIGRAIN, et al. 1991.

## 2.4 Estresse oxidativo

O termo estresse oxidativo foi originalmente definido para conceituar um distúrbio no equilíbrio pró-oxidante-antioxidante, favorecendo os oxidantes (SIES 1985). No entanto, atualmente a definição mais recente do estresse oxidativo, descreve como um desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes em benefício dos oxidantes, que conduz alterações na sinalização redox, levando a lesão molecular (SIES e JONES, 2007; SIES, 2015). Além disso, o estresse oxidativo também é definido como resultado de alterações nas defesas antioxidantes ou sistemas de

reparação quando ocorrem alterações nos tecidos ou lesões (BURHANS e HEINTZ 2009; JONES 2008). Nesse contexto, a lesão está relacionada a qualquer alteração em funções essenciais ou viabilidade de uma célula, tecido ou organismo, podendo levar a morte celular (BURSCH et al. 1992).

#### **2.4.1 Espécies reativas de oxigênio (EROS) e nitrogênio (ERNs) e radicais livres**

As espécies reativas de oxigênio (EROS) e de nitrogênio (ERNs) são átomos ou moléculas que contém um número ímpar de elétrons em sua última camada eletrônica. EROS e ERNS são encontradas em todos os sistemas biológicos, neste grupo estão inclusos os radicais livres (HALLIWELL, 2006; VASCONCELOS et al. 2007). Os radicais livres se referem a um átomo ou molécula altamente reativas e instáveis (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1990; JAMES e LARS-OLIVER, 2015), que são gerados a partir do metabolismo aeróbico normal, bem como por reações anormais ocasionadas por alguma doença ou xenobióticos (SIES, 1986).

Alguns exemplos de EROs considerados radicais livres são: radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), óxido nítrico ( $NO^{\cdot}$ ) e radical hidroxil ( $^{\cdot}OH$ ). Também são considerados com radicais livres, os metais de transição como ferro, cobre, manganês e o oxigênio molecular por possuir dois elétrons não pareados localizados em diferentes orbitais e que possuem o mesmo número de spin (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1984). Entretanto, as EROs também podem ser moléculas não-radicalares como peroxinítrito ( $ONOO^-$ ) e peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ).

Em situações fisiológicas, as EROs podem ser produzidos durante o metabolismo celular aeróbio, visto que, geralmente cerca de 95 a 98% do oxigênio é absorvido pelos organismos aeróbicos. Durante este processo de produção, o oxigênio é reduzido formando água na cadeia respiratória por meio do transporte de elétrons mitocondrial, bem como no retículo endoplasmático, pelo sistema enzimático citocromo C durante o processo de fosforilação oxidativa (FERREIRA et al. 1997). No decorrer da formação da água, entre 2 a 5% de oxigênio molecular

sofre redução incompleta, originando intermediários reativos, tais como o radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), hidroperoxil ( $HO_2^{\cdot}$ ), hidroxil ( $\cdot OH$ ) e peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ).

As EROs podem ser geradas por outros processos, tais como: fagocitose, ativação de leucócitos e a metabolização de determinadas drogas (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007). As ERNs desempenham importante papel no metabolismo humano e em diversas condições fisiológicas. Entre as essas espécies estão as seguintes moléculas radicalares e não radicalares: óxido nítrico ( $NO^{\cdot}$ ), óxido nitroso ( $N_2O_3$ ), ácido nitroso ( $HNO_2$ ), nitritos ( $NO_2^-$ ), nitratos ( $NO_3^-$ ) e peroxinitritos ( $ONOO^-$ ) (BARREIROS et al. 2006).

Dentre as ERNs, o  $NO^{\cdot}$  é uma das espécies mais importantes, em razão de ser um radical livre de meia vida curta, que apresenta elevada importância em processos fisiológicos como a vasodilatação (RADI 2013). Este radical é sintetizado a partir da conversão do aminoácido L-arginina em L-citrulina, reação catalisada pela enzima óxido nítrico-sintase (NOS) na presença de oxigênio, NADPH (fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida), e outros cofatores (ANDREW e MAYER, 1999).

O  $NO^{\cdot}$  é solúvel tanto no ambiente lipídico quanto no aquoso, sendo sim, ao reagir com o oxigênio e água libera ânions nitrito e nitrato. Sua reação com o superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) promove a liberação de peroxidonitrato, que é um potente agente oxidante capaz de causar fragmentação de DNA e oxidação lipídica (MARNETT, 1999; OHKAWA et al. 1979). Além disso, em células de mamíferos, o peroxinitrito tem numerosos efeitos deletérios levando desde a oxidação e nitração de biomoléculas à perturbação de processos de sinalização e a indução de morte celular (KLOTZ 2002; RADI 2013). Nesse contexto, as células estão continuamente produzindo espécies reativas como parte do seu metabolismo normal celular, úteis para uma série de processos, como resposta imunológica e sinalização celular. No entanto, estes radicais podem ser neutralizados pelo processo de defesa, os antioxidantes celulares (SULTANA et al. 2013).

Quadro 4 - Principais características das espécies reativas formadas no organismo.

| Espécie reativa  | Características   | Fontes Produtoras   |
|--|---|---|
| (O <sub>2</sub> <sup>•-</sup> )<br>Radical superóxido      | Formado após a primeira redução do O <sub>2</sub> ;<br>Produzido durante a ativação de neutrófilos, monócitos, macrófagos e eosinófilos.  | Xantina oxidase;<br>NADPH oxidase;<br>Superóxido;<br>Cadeia de transporte elétrons. |
| (HO <sub>2</sub> <sup>•</sup> )<br>Radical hidroperoxila   | Representa a forma protonada do radical superóxido;<br>É mais reativo que o superóxido;<br>Maior facilidade em iniciar a destruição de membranas biológicas.  | Peroxidação lipídica  |
| ( <sup>•</sup> OH)<br>Radical hidroxil                     | Considerada a ERO mais reativa em sistemas biológicos;<br>Reage rapidamente com metais ou outros radicais;<br>Pode inativar várias proteínas, danificar membranas celulares, modificar bases nitrogenadas.                                | Reação de Fenton;<br>Decomposição do peroxinitrito.                                 |
| (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )<br>Peróxido de hidrogênio | Não é um radical livre, pois há ausência de elétrons desemparelhados na última camada;<br>Natureza reativa pode levar a lesões se não for controlada por sistemas antioxidantes;<br>Atravessa camadas lipídicas.                          | Superóxido dismutase;<br>Glutathione oxidase.                                       |
| (NO <sup>•</sup> )<br>Óxido nítrico                        | Apresenta-se em grande quantidade no organismo humano;<br>Atua como sinalizador molecular na: neurotransmissão, regulação da pressão arterial, relaxamento da musculatura lisa e regulação do sistema imune;<br>Baixo tempo de meia vida. | Óxido nítrico sintase;<br>Redução dos estoques de nitrato/nitrito.                  |
| (ONOO <sup>-</sup> )<br>peróxido nitrito                   | Potente agente oxidante capaz de causar fragmentação de DNA e oxidação lipídica;<br>Gás de elevada reatividade.   | Formado pela reação entre O <sub>2</sub> <sup>•-</sup> e NO <sup>•</sup>            |

Fonte: FERREIRA e MATSUBARA, 1997.

## 2.4 Peroxidação Lipídica

A peroxidação lipídica é um processo que ocorre nas membranas celulares, por meio da reação em cadeia, representada pelas etapas de iniciação, propagação e terminação, (HALLIWELL, 1992). Estas reações estão apresentadas na figura 5, onde L representa o lipídio.

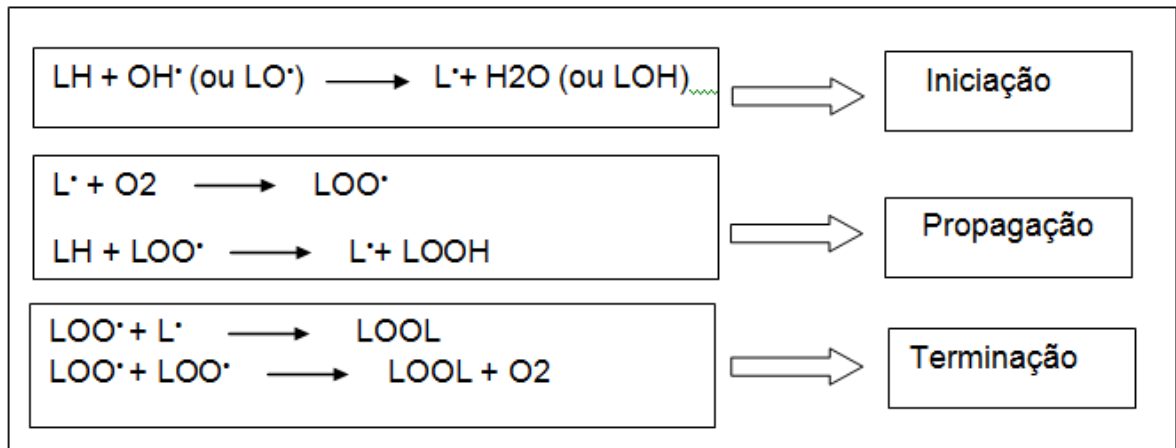


Figura 5. Etapas da Peroxidação lipídica

Fonte: FERREIRA e MATSUBARA, (1997).

A maioria dos componentes celulares são suscetíveis à ação das EROS, no entanto, a membrana é um dos mais atingidos em decorrência da peroxidação lipídica, que provoca alterações na estrutura e na sua permeabilidade (MARNETT, 1999; OHKAWA et al. 1979). Por consequência, ocorre perda da seletividade na troca iônica e liberação do conteúdo de organelas, como as enzimas hidrolíticas dos lisossomos, formando assim produtos citotóxicos como o MDA (VAN KUIJK et al. 1987). O MDA tem a capacidade de se ligar covalentemente a grupos nucleofílicos presentes em DNA, peptídeos e proteínas, causando modificações nas funções dessas moléculas, com isso o MDA pode ser usado como marcador de peroxidação lipídica nos tecidos (HALLIWELL e CHIRICO, 1993).

A peroxidação lipídica também está associada aos mecanismos de envelhecimento, câncer e exacerbação da toxicidade de xenobióticos (SHAN et al. 1990). Estas modificações oxidativas afetam canais iônicos, proteínas de transporte, inativam enzimas, provocando alteração na fluidez e da permeabilidade da membrana, promovendo assim, expansão do líquido intracelular, ruptura da membrana da célula e das organelas, conseqüentemente a morte celular (SIES e STAHL, 1995). Entretanto, os processos de lipoperoxidação nem sempre são prejudiciais, pois seus produtos são importantes para síntese de leucotrienos e na reação em cascata a partir do ácido araquidônico que está relacionado a formação de prostaglandinas e na resposta inflamatórias (SODIN et al. 1990).

## 2.6 Sistema de defesa Antioxidante

Antioxidantes são moléculas capazes de reagir com EROs e ERNs, reduzindo sua reatividade ou inativando-as, mesmo em baixas concentrações em relação a seu substrato. Os antioxidantes impedem a transformação dos radicais livres em produtos mais tóxicos para as células (ROSS e MOLDEUS, 1991). Desta forma, esses mecanismos de defesa protegem os sistemas biológicos contra os efeitos deletérios dos processos ou das reações que levam a oxidação de macromoléculas ou estruturas celulares (JORDÃO et al. 1998; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2000; BARREIROS et al. 2006).

Os antioxidantes podem ser enzimáticos ou não enzimáticos (SIES, 1993). As defesas enzimáticas são representadas principalmente pelas enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GSH-Px), glutathione reductase (GR). As não-enzimáticas são, glutathione reduzida (GSH) as vitaminas A, E e C, flavonoides e ubiquinonas ( MIEYAL et al. 1995; ALEXI et al. 1998; GIANNI et al. 2004).

Quando os radicais livres estão em excesso, os antioxidantes podem neutralizá-los (HEBBEL,1986). Para isso, o organismo apresenta três mecanismos de defesa, em níveis diferentes: prevenção da formação dos EROs que envolve um sistema de defesa antioxidante mais amplo. Entre esses sistemas, está o transporte do oxigênio na forma ligada e não livre, a quelatação dos metais durante o transporte e armazenamento, evitando assim a reação de Fenton, e a restrição do Spin do oxigênio que diminui sua reatividade (SIES, 1993). Além disso, ainda há o mecanismo de reparo de DNA ocasionado pelos EROs: reparo de excisão de bases (REB), reparo de excisão dos nucleotídeos (REN) e reparo de erro de pareamento (REP), (LUNEC, et al. 2002).

Os antioxidantes não enzimáticos agem por meio de moléculas que protegem os principais alvos biológicos da oxidação, podendo apresentar três características: supressão da formação de radical livre, isto é, quelatação de metais; inibição de



enzimas formadoras de radicais livres, retirada ou desativação de radicais livres e; participação no processo de reparo (BOURNE e RICE-ERVANS, 1999).

Outro antioxidante importante é a glutathiona reduzida (GSH), um tripeptídeo composto de aminoácidos não essenciais formado por glicina, ácido glutâmico e cisteína, que constitui o tiol mais abundante no meio intracelular. Sua capacidade redutora é determinada pelo grupamento-SH, presente na cisteína (SIES, 1985). A GSH pode ser considerada um dos agentes mais importantes do sistema de defesa antioxidante da célula, protegendo-a contra a lesão resultante da exposição a agentes como íons ferro, oxigênio hiperbárico, radiação e luz ultravioleta (GALLEANO e PUNTARULO, 1989). Além disto, atua como transportadora e reservatório da cisteína e participa da detoxificação de agentes químicos e da eliminação de produtos da lipoperoxidação (DENEKE e FANBURG, 1989).

## **2.7 A interação do exercício físico, fluoxetina e o estresse oxidativo**

Como relatado, a fluoxetina pode elevar a neurotransmissão serotoninérgica cerebral, podendo ser usada em doenças neurológicas como, depressão, ansiedade e TOC (WONG et al. 1991), assim como, no córtex, foi capaz de diminuir a excitabilidade (AMÂNCIO et al. 2006). Além disso, estudos mostram que a redução da serotonina também pode estar envolvida com várias doenças psiquiátricas (SHARP e COWEN, 2011; CRESCENZO et al. 2014).

Atualmente, não apenas medicamentos estão sendo utilizados para o tratamento de alterações comportamentais, provocadas pela baixa de serotonina no SNC, mas também alternativas não medicamentosas como a prática de exercício físico regular (BECKMAN e SANTOS, 2013). Essa prática traz inúmeros benefícios para os praticantes, por exemplo, o aumento da neuroplasticidade em vários locais do sistema serotoninérgico central. Por outro lado, a maioria dos efeitos benéficos que exercício físico moderado proporciona, são perdidos quando essa atividade é realizada exaustivamente (GREENWOOD e FLESHNER, 2011).

O exercício físico exaustivo aumenta a demanda de oxigênio nos sistemas orgânicos, elevando pelo menos 35 vezes a mais demanda de oxigênio do que em repouso, levando a desregulação da homeostase e aumento do estresse oxidativo (ASTRAND, 1977; GAETANI et al. 1974; ALESSIO, 1993). Durante o exercício físico existem basicamente dois importantes processos celulares envolvidos na formação de EROs, são eles: fluxo de elétrons pelo sistema de transporte de elétrons mitocondrial, atividade do ciclo de degradação de purinas, processo importante na indução de danos celulares em órgãos submetidos à isquemia seguida de reperfusão. O primeiro processo é mais importante em exercício físico prolongado e o segundo em situações em que o metabolismo anaeróbio alático predomina na obtenção de energia: contração muscular isométrica, treinamento de força, corridas de curta duração intensa e exercício em ambiente hipóxico (JI, 1995).

A grande produção de EROs é responsável por várias ações deletérias no organismo, tais como: aumento da peroxidação de lipídios de membranas (ALESSIO, 1993), aumento dos danos em proteínas e ácidos nucleicos, DNA (ácido desoxirribonucleico) e RNA (ácido ribonucleico) (RADAK et al. 1999), além de alterar ou prejudicar o metabolismo intracelular levando a morte celular (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1989).

Além disso, estes danos oxidativos têm sido relacionados à etiologia de várias doenças, tais como as cardiopatias e aterosclerose (BATLOUNI, 1997), diabetes tipo II (MANFREDINI et al. 2010), problemas pulmonares (FERREIRA et al, 1997), erros inatos do metabolismo (SITTA et al. 2009; RIBAS et al. 2010), envelhecimento cutâneo (HIRATA et al. 2004), carcinogênese (LOUREIRO et al. 2002), etc.

O princípio de que os EROs podem ser formadas em quantidades acima do normal nos tecidos e órgãos de animais e humanos durante o exercício físico, foi investigado primeiramente por Dillard, et al. (1978), que mostraram que durante o exercício físico ou na contração muscular intenso, pode ocorrer: aumento na formação intracelular de radical hidroxil ( $\cdot\text{OH}$ ), produção intracelular de radical superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) e peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) com possibilidade de liberação de ambos para o meio extracelular (VASCONCELOS et al. 2007).

Nesse contexto, o exercício físico e a fluoxetina são ativadores do sistema serotoninérgico, sendo de grande importância estudar o efeito farmacológico e comportamental da combinação desses fatores em modelo de atividade física exaustiva. Pois estudos realizados por Sastre et al. (1992) e revisados por Vina et al. (2000) comprovaram que apenas o exercício exaustivo induz o estresse oxidativo em nível significativo para o organismo. Estudos sobre o estresse oxidativo realizados com animais experimentais e seres humanos demonstraram que o aumento na atividade metabólica favorece a ocorrência de lesões oxidativas em biomoléculas (JENKINS, 2005; BENZI, 1993). A utilização da fluoxetina promove o aumento da oxidação proteica e lipídica (INKIELEWICZ-STEPNIAK, 2011).

Nos estudos de Sakr et al. (2015) com ratos, os dados mostraram que a fluoxetina levou ao estresse oxidativo, com aumento nos níveis de MDA e diminuição dos antioxidantes. Ratos tratados com fluoxetina apresentaram excessiva produção de EROs e um sistema de defesa antioxidante deficiente no fígado (STEPNIAK, 2011). Entretanto outros estudos mostraram alterações nas concentrações de serotonina após a utilização da fluoxetina e redução dos níveis de EROS (KHANZODE et al. 2003; ZAFIR et al. 2009; AHMAD et al. 2010; MORETTI et al. 2012).

Greenwood et al. (2003), avaliaram os efeitos do exercício físico sobre comportamento semelhante a ansiedade em roedores, mostraram que houve redução da ansiedade. Por outro, Pietropaolo et al. (2008) relataram que não houve nenhum efeito. Diante disso, alguns autores relatam que essa controversa de informações está relacionada com o protocolo de exercício.

### **3. Objetivo geral**

Avaliar os efeitos do tratamento subcrônico com fluoxetina sobre os comportamentos e os parâmetros oxidativos de ratos submetidos ao exercício físico exaustivo.

#### **3.1 Objetivos específicos**

- Avaliar o efeito da fluoxetina na atividade locomotora espontânea no teste de campo aberto e o comportamento semelhante a ansiedade no teste de labirinto em cruz elevado em ratos tratados com fluoxetina e expostos ao exercício físico exaustivo.
- Avaliar no sangue e tecido de ratos tratados com fluoxetina e expostos ao exercício físico exaustivo, os níveis de fatores antioxidantes como: tripeptídeo Glutathiona reduzida (GSH) e a capacidade de antioxidante total por meio do método de TEAC;
- Determinar os níveis de óxido nítrico (NO) no sangue e tecido de ratos tratados com fluoxetina e expostos ao exercício físico exaustivo;
- Quantificar a concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), como malondialdeído (MDA), no sangue e tecido de ratos tratados com fluoxetina e expostos ao exercício físico exaustivo.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Animais de experimentação

Este projeto foi primeiramente submetido à Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Pará, aprovado pelo CEUA sob parecer nº 1751130116, obedecendo-se aos critérios, estabelecidos nas normas Guias de Cuidado e Uso de Animais em Laboratoriais.

Neste estudo, foram utilizados 40 ratos machos adultos da linhagem *Wistar* (*Rattus norvegicus*) com idade de aproximadamente 60 dias e massa corpórea aproximadamente 150g, provenientes do Biotério do Instituto de Ciências da Saúde (ICS) da Universidade Federal do Pará (UFPA). Os animais foram mantidos no Biotério de Faculdade de Farmácia durante o tempo de experimento, em condições padronizadas de temperatura ( $24^{\circ}\pm 2^{\circ}\text{C}$ ), exaustão, ciclo de luz claro/escuro de 12 horas (06:00h – 18:00h), armazenados em gaiolas, grupos de cinco animais, com livre acesso água e comida ad libitum.

Os testes comportamentais foram realizados no Laboratório de Farmacologia da Inflamação e do Comportamento (LAFICO), da Faculdade de Farmácia, do ICS-UFPA. Os experimentos foram divididos em duas etapas, na primeira ocorreu exercício físico (nado forçado) mais teste comportamental. Na segunda etapa foram retiradas amostras de tecidos e sangue para avaliação dos parâmetros oxidativos que foram dosados no Laboratório de Ensaio *in vitro* de Imunologia e Microbiologia (LBEIM), da Faculdade de Farmácia, ICS-UFPA.

### 4.2 Obtenção da fluoxetina e via de administração

A fluoxetina utilizada no presente trabalho foi na forma farmacêutica de pó como substância pura, obtida em farmácia de manipulação por meio de prescrição médica, a droga foi solubilizada em solução salina (NaCl a 0,9%). A dose da

fluoxetina usada foi de 10mg/kg/dia peso corporal de cada rato, administrada por via intraperitoneal (i.p). A dose e a via de administração desse estudo, baseou-se em trabalhos anteriores de Fernandes et al. (2012).

Quadro 5 – Materiais utilizados no tratamento farmacológico

| <b>Materiais utilizados no tratamento</b> |             |
|---|-------------|
| Fluoxetina                                | Pó          |
| NaCl 0,9%                                 | Estéril     |
| Seringas de 1ml                           | Descartável |
| Agulhas hipodérmicas                      | 13x 0,38 mm |

### 4.3 Grupos experimentais

Utilizou-se 40 ratos, os quais foram divididos em quatro grupos experimentais com 10 animais cada. Os grupos estão representados no quadro 05:

Quadro 6 – Grupos experimentais, tratamento e número de animais por grupo.

| <b>Grupos</b>                               | <b>Descrição dos grupos</b>   | <b>N° animais</b> |
|---|---|-------------------|
| <b>01<br/>(Controle sedentário)</b>         | Ratos sedentários submetidos ao tratamento com NaCl 0,9%;                       | 10                |
| <b>02<br/>(Fluoxetina sedentário)</b>       | Ratos sedentários submetidos ao tratamento com fluoxetina;                      | 10                |
| <b>03<br/>(Controle Exercício físico)</b>   | Ratos submetidos ao tratamento com NaCl 0,9% e com a prática exercício físico;  | 10                |
| <b>04<br/>(Fluoxetina Exercício físico)</b> | Ratos submetidos ao tratamento com fluoxetina e com a prática exercício físico. | 10                |

Além do teste citado acima, no oitavo dia de experimento todos os 40 animais foram submetidos aos testes comportamentais de campo aberto e ao labirinto em cruz elevado.

#### 4.4 Tratamento farmacológico

Os animais foram tratados de forma subcrônica com fluoxetina, com duração de 7 (sete) dias, esse tratamento foi adaptado dos estudos de Dulawa, et al. (2004) e Pilar-Cuéllar et al. (2011). Após a pesagem e uma hora de ambientação dos 40 animais no laboratório, os mesmos receberam uma única administração i.p. diária de fluoxetina (10 mg/kg, dissolvido em solução salina (NaCl a 0,9%) e de solução salina a 0,9% e após 30 minutos da injeção, os animais foram expostos ao exercício físico. O horário de administração foi mantido durante todo o experimento (SANCHEZ et al. 2008).

Os testes foram realizados em sala própria, com temperatura de aproximadamente 25°C e atenuação dos níveis de ruído e baixa intensidade de iluminação. Todos os experimentos foram conduzidos entre 8:00 às 14:00 horas, para evitar qualquer possível influência do ritmo circadiano sobre as avaliações. A fluoxetina e NaCl 0,9% foram injetados entre 9 e 10 horas, durante 7 dias adaptado de Dulawa, et al. (2004) e Pilar-Cuéllar et al. (2011). Os grupos experimentais 01 e 03 foram submetidos ao tratamento com NaCl a 0,9%, enquanto os grupos 2 e 4 com a fluoxetina, de acordo com o quadro 6. Após 30 minutos da injeção, cada animal dos grupos 3 e 4 foram colocados para realizar exercício físico exaustivo (nadar) durante 20 minutos, os quais foram cronometrados (figura 6).

No oitavo dia de experimentos, os 40 animais foram submetidos a testes comportamentais: Teste do Campo Aberto (TCA) para avaliar a locomoção espontânea e o Labirinto em Cruz Elevado (LCE) para avaliar o comportamento semelhante a ansiedade desses animais. Depois, os animais foram eutanasiados com deslocamento tronco-cervical, em seguida, o sangue, o fígado e cérebro foram coletados e armazenados em -20°C para avaliação dos parâmetros oxidativos. Após a coleta, as carcaças foram acondicionadas em sacos brancos de material biológicos e conduzidos para descartes com acordo com os planos de gerenciamento de resíduos sólidos (PGRS) da instituição.

Quadro 7– Cronograma, grupos e atividades durante os experimentos.

| <b>Dias</b> | <b>Grupos</b>                                 | <b>Cronograma dos testes comportamentais</b>   |
|-------------|---|--|
| 1º - 7º     | G1- Controle sedentário (10 animais)          | Pesagem dos ratos e administração i.p. de NaCl 0,9%;   |
| 1º - 7º     | G2 – Fluoxetina sedentário (10 animais)       | Pesagem dos ratos e administração i.p. de fluoxetina;  |
| 1º - 7º     | G3 – Controle exercício físico (10 animais)   | Pesagem dos ratos e administração i.p. NaCl 0,9% + exercício físico exaustivo (nado forçado) durante 20 minutos;     |
| 1º - 7º     | G4 – Fluoxetina exercício físico (10 animais) | Pesagem dos ratos e Administração i.p. de fluoxetina + exercício físico exaustivo (nado forçado) durante 20 minutos; |
| 8º          | G1, G2, G3 e G4                               | Testes de campo aberto e labirinto em cruz elevado mais coleta de sangue e órgãos (fígado e cérebro).                |

#### 4.5 Exercício físico

O exercício físico por meio nado forçado, busca estimular respostas a um treinamento com dominância do metabolismo aeróbico. Essa atividade obriga os animais a realizarem exercício físico forçado com intensidade, levando o maior consumo de oxigênio e maiores solicitações energéticas. Além disso, a pressão da água acaba impondo aos animais um menor estresse mecânico e o engajando vários grupos musculares durante o exercício (JOLITHA et al. 2006).

O modelo de exercício físico exaustivo utilizado neste trabalho foi adaptado de Polotow (2014), a definição da condição exaustiva foi quando o animal nadou até ao esgotamento físico e permaneceu submerso não respondendo por aproximadamente 3 a 5 segundos. O tempo considerado de esgotamento dos animais foi de 20 minutos/dia (Figura 6) (LANCHA et al. 1995; FINSTERER 2012).



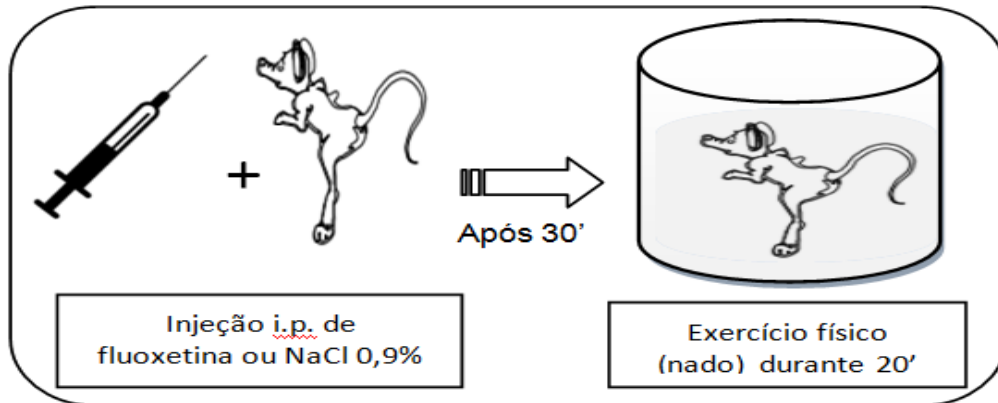


Figura 6. Processos para a realização do exercício físico exaustivo.

O exercício físico consistiu em colocar cada rato em contato com a água em um cilindro de vidro de aproximadamente 50 cm de altura e 30 cm de diâmetro, em uma temperatura de  $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$  (figura 7). A quantidade de água foi suficiente para que o animal não apoiasse a pata nem a calda no fundo do cilindro. Então durante 20 minutos cronometrados diariamente durante 7 dias, os animais realizavam essa sessão de exercício físico exaustivo que constituiu saltar e nadar, uma vez que, as atividades forçadas obrigam os animais a realizarem o exercício físico em maior intensidade. Após o término do teste, os animais foram retirados do equipamento e secos com auxílios de papel toalha e palha seca, depois colocados na gaiola de origem.

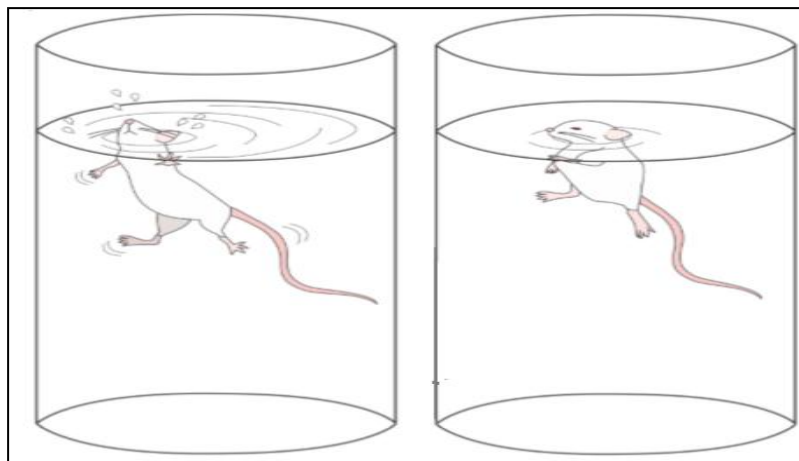


Figura 7. Prática de exercício físico (nado forçado).  
Fonte: Adaptado de (MELLO, 2006).

## 4.6 Testes comportamentais

### 4.6.1 Teste do Campo Aberto (*open field*)

Este teste é considerado um modelo sensível a drogas com atividade ansiolítica (PRUT e BELZUNG, 2003). O TCA tem como objetivo principal avaliar a locomoção espontânea e a emocionalidade dos animais (ratos e camundongo), que estão relacionados com comportamento do tipo ansiedade (HALL, 1934). O TCA é também amplamente utilizado para avaliar o efeito de drogas e de manipulações genéticas e ambientais sobre os animais. Substâncias estimulantes do SNC tendem a aumentar os parâmetros comportamentais, enquanto que substâncias depressoras tendem a diminuí-los (ARCHER, 1973; RAMOS E MORMÉDE, 1998).

O TCA consiste em colocar o animal em um ambiente desconhecido, cercado por paredes de cor pretas (figura 8), no qual são observados parâmetros de comportamento como, por exemplo, o tempo de permanência na periferia e a permanência no centro do campo, além disso, esse teste possibilita a avaliação de medidas de exploração, como; locomoção, levantamento e farejamento, e medidas aversivas de defecação, micção e congelamento (NAHAS, 2001). A tendência natural do animal em um ambiente novo é a de explorá-lo, apesar do conflito com o medo provocado pelo novo ambiente (BOURIN et al. 2007).

Neste experimento, todos os 40 animais foram submetidos individualmente à análise da capacidade locomotora/exploratória, os animais foram avaliados através de diferentes parâmetros. O ambiente estava com luminosidade normal (luzes brancas), a arena utilizada foi de madeira (100x100x40cm), pintada com material não permeável de cor preta (figura 8). Os animais foram colocados individualmente no centro da arena, sempre na mesma posição. Sendo permitido o livre deslocamento dentro do aparato por 5 minutos, os quais foram cronometrados.

Durante o teste, os parâmetros foram registrados por captura de vídeo e a análise foi realizada pelo *software* ANY-maze® versão 4.99, que contabilizou os

seguintes indicadores: distância total percorrida e tempo na área central, (PANDOLFO, et al. 2007), o parâmetro número de levantamentos foi contabilizado manualmente. Ao termino de cada teste, a arena foi limpa com álcool a 10% entre um animal e outro. Essa limpeza é realizada para retirada, de bolos fecais e urina, ou de qualquer outro odor que possa interferir nos comportamentos desses animais, e por consequência no resultado final dos experimentos.

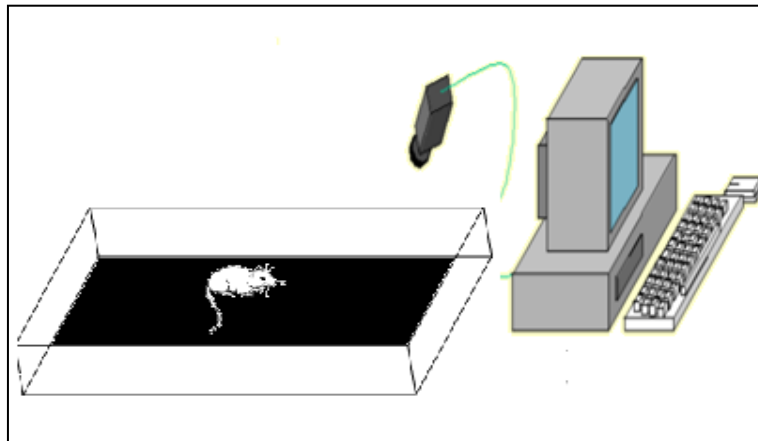


Figura 8. Aparato do teste de campo aberto  
Fonte: Adaptado de (MELLO, 2006).

#### 4.6.2 Teste do Labirinto em Cruz Elevado (LCE)

O LCE é um dos principais testes utilizados na investigação do comportamento semelhante a ansiedade, utilizando-se ratos e camundongos (CAROBREZ e BERTOGLIO, 2005; PELLOW et al. 1985). O aparato para realização do LCE (Figura 9) consiste de dois braços abertos opostos cruzados em ângulo reto com dois braços cercados lateralmente por uma parede de 15 cm de altura (braços fechados). Este teste é baseado na aversão natural de roedores em espaços abertos e usa o conflito entre a exploração e aversão a este tipo de lugar. (HANDLEY e MITHANI, 1984).

A partir do LCE foram avaliados os seguintes parâmetros: percentagem de entradas no braço aberto (%EBA), percentagem do tempo de permanência dos animais nos braços abertos (%TBA) e número de entradas dos animais nos braços fechados (EBF). O teste consistiu em colocar individualmente cada animal

posicionado no centro do aparato, com a face voltada para um dos braços fechados, permitindo assim, a exploração do equipamento por 5 minutos cronometrado. Após cada sessão de teste, o aparato foi limpo com auxílio de papel toalha e álcool a 10% (BAHI, 2013; PANDOLFO et al. 2007; PELLOW e FILE, 1986).

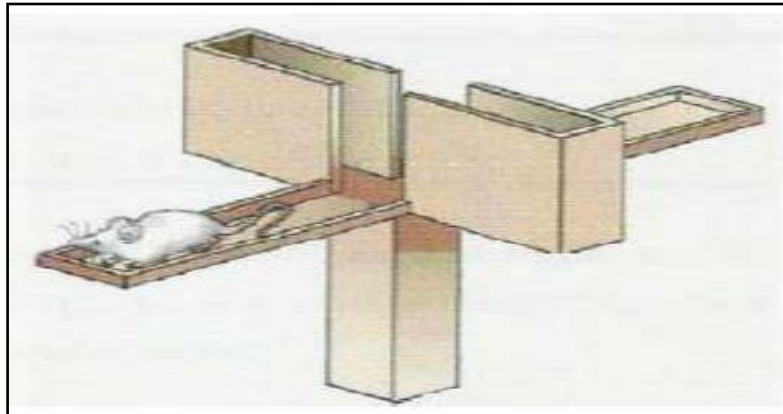


Figura 9. Aparato do labirinto em cruz elevado, com os braços fechados e abertos opostos conectados pela plataforma central. Fonte: MELLO, 2006.

#### 4.7 Coleta de sangue e órgãos dos animais

Ao término dos testes comportamentais, os 40 animais foram eutanasiados individualmente, por meio de deslocamento cervical, que é um procedimento rápido e consiste no rompimento da medula espinhal do animal e consequente perda total de sensibilidade e morte, (ANDRADE, 2002). Em seguida foi realizada a coleta de sangue e órgãos. O sangue foi coletado da região intraventricular, com auxílio de materiais cirúrgicos (tesouras, pinças, alicates e entre outros) para abertura da cavidade torácica. Usou-se seringa de 3 ml e agulha 25x7 para a perfuração do coração na região do ventrículo esquerdo, de onde foi retirado entre 1 a 3 ml de sangue de cada animal. Após a coleta, o sangue foi transferido para tubos de ensaio de 5 mL devidamente identificados, os quais continham EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético), 1 gota para cada mL de sangue coletado, evitando assim a coagulação das amostras.

As amostras sanguíneas foram homogeneizadas e colocadas em centrífuga a 2500 rpm durante 10 minutos para separação do plasma. Realizou-se a coleta do

plasma com auxílio de pipeta automática, os quais foram armazenados em *eppendorf* de 1,5 mL e acondicionadas sob refrigeração (-20°C). Após a coleta de plasma, ocorreu a lavagem de hemácias, por três vezes sucessivas com solução fisiológica. A lavagem ocorreu por meio da centrifugação em 2500 rpm durante 5 minutos, sempre desprezando o sobrenadante e adicionado NaCl a 0,9% a cada lavagem. Após o final da lavagem, o concentrado de hemácia foi transferido para *eppendorf* de 1,5 mL identificados, acrescentou-se aos mesmos a solução fisiológica na mesma quantidade do concentrado de hemácias, os transformando em concentrado de hemácias a 50%. Ao final foram acondicionados (-20°C) para dosagens dos parâmetros do estresse oxidativo.

A coleta dos órgãos foi feita com auxílio de materiais cirúrgicos, por meio de uma incisão na parede abdominal logo abaixo da caixa torácica, cuidadosamente foram retirados o fígado. O cérebro foi coletado por decapitação dos animais, para isso se realizou incisões nos crânios até a cavidade craniana e a retirada do cérebro. Esses órgãos foram lavados com NaCl 0,9% para uma maior higienização e tampão fosfato-salino (PBS a 1x) para melhor manter a conservação dos órgãos, em seguida foram armazenados em tubos falcon e *eppendorf* identificados e sob refrigeração (-20°C). A disrupção dos órgãos foi realizada com auxílio de um disruptor de célula ultrassônico. Além disso, foram diluídos em PBS a 10X e centrifugados para separação e coleta do sobrenadante.

## **4.8 Determinação dos parâmetros de estresse oxidativo**

### **4.8.1 Dosagem do óxido nítrico**

A determinação de óxido nítrico (NO<sup>•</sup>) foi realizada por procedimentos espectrofotométricos baseados na reação de Griess (sulfanilamida e N-1-naftiletilenodiamina). A reação de nitrito presente na amostra e o reagente de Griess origina um cromógeno de cor rosa, que é detectado por leitor de ELISA em comprimento de onda de 540 nm. As concentrações de NO<sup>•</sup> na amostra foram

determinadas como descrito por Granger et al. (1999). As absorbâncias das amostras foram comparadas aos valores obtidos da curva padrão realizada com nitrato de sódio e os resultados encontrados foram expressos em  $\mu\text{Mol}$ .

As amostras foram desproteinizadas com auxílio de sulfato de zinco ( $\text{ZnSO}_4$ ) 15 g/L, em seguida centrifugadas a 3000 rpm durante 15 minutos, sendo pipetado o sobrenadante. Foram adicionados primeiramente 100 $\mu\text{L}$  dessa amostra em microplacas de 96 poços, em seguida mais 100 $\mu\text{L}$  do reagente de Griess. A microplaca foi coberta com papel alumínio e ficou em repouso à temperatura ambiente e no escuro por 10 minutos. A leitura foi realizada em leitor de ELISA com absorbância de 570 nm (figura 10).

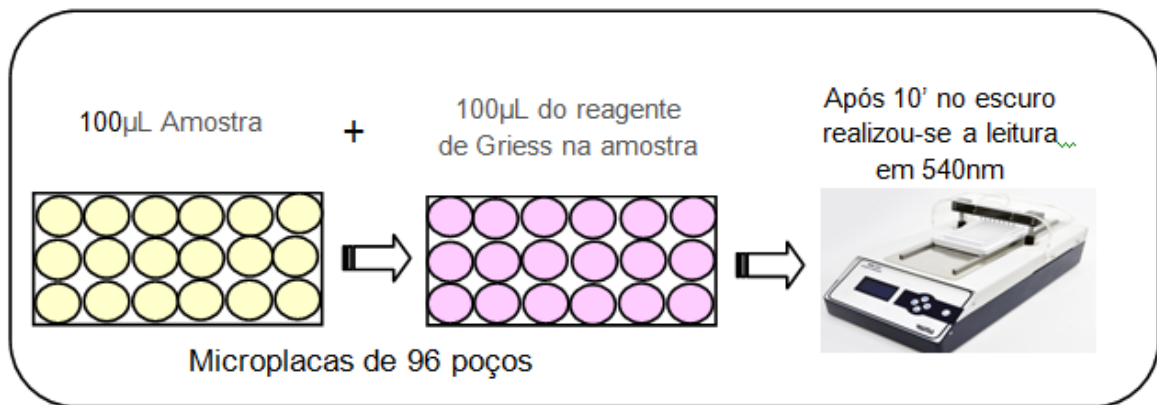


Figura 10. Esquema da técnica para a realização da determinação do NO.

#### 4.8.2 Avaliação da capacidade antioxidante total equivalente ao Trolox (TEAC)

Para determinação deste parâmetro foi realizado o teste TEAC, que consiste na inibição do cátion  $\text{ABTS}^{+\cdot}$  (radical 2,2-azinobis [3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato], sal de diamônio), por antioxidantes presentes na amostra (VASCONCELOS et al. 2007). A metodologia empregada neste trabalho foi adaptada de Rufino et al. (2007).

Inicialmente, foi preparada solução salina isotônica (PBS) com pH 7,2 que foi utilizada como solvente no preparo de reagentes e na diluição das amostras. Em seguida, preparou-se as seguintes soluções estoques: 7 mM de ABTS (SIGMA-

ALDRICH®) e uma solução de persulfato de potássio ( $K_2S_2O_8$ ) (SIGMAALDRICH®) com concentração final de 2,45 mM. A partir da mistura destas duas soluções foi originada uma solução e radical cátion  $ABTS^{+}$ , que ficou em repouso em temperatura ambiente e com ausência de luz por 16 horas, originando assim, uma solução de cor azul marinho. Após 16 horas da preparação da solução de estoque de  $ABTS^{+}$ , preparou-se a solução de trabalho. Por meio da mistura vagarosamente das soluções de estoque de  $ABTS^{+}$  mais PBS até que a absorvância em espectrofotômetro atingisse a  $0,7 \pm 0,02$ . Antes do início da leitura o espectrofotômetro foi calibrado na leitura de 734 nm e zerado com PBS.

O início das dosagens das concentrações da capacidade antioxidante total equivalente Trolox e das amostras do plasma e dos órgãos se deu, após todas as soluções e reagentes preparados. Foram separados 6 tubos de ensaio, identificados de “A” a “F”, para colocar solução de estoque de Trolox e PBS em cada tubo para construir uma curva padrão da atividade antioxidante de Trolox em função da concentração.

Foi adicionada 2970  $\mu$ l da solução de trabalho em uma cubeta, realizou-se a leitura da absorvância em espectrofotômetro, este valor corresponde ao T0. Posteriormente, foram acrescentados 30  $\mu$ L da solução de Trolox, homogeneizado e acionando o cronômetro para marcar 5 minutos, que corresponde a absorvância do T5. O processo foi repetido para cada tubo (A-F). As leituras das amostras foram realizadas igualmente, sendo que, foi acrescentado 30  $\mu$ l da amostra de plasma à solução de trabalho ao invés da solução de Trolox. O percentual de inibição de  $ABTS^{+}$  é determinado em função do tempo. A capacidade antioxidante total das amostras foi expressa em  $\mu$ mol/L valores correspondentes a concentração do Trolox com capacidade antioxidante equivalente à das amostras analisada (MILLER et al. 1993; RE et al. 1999).

### 4.8.3 Determinação da atividade da Glutaciona

A determinação dos níveis intracelulares da forma reduzida da GSH, baseia-se na capacidade da GSH em reduzir o ácido-5,5-ditiobis-2-nitrobenzóico (DTNB) para ácido nitrobenzóico (TNB), que é quantificado por espectrofotometria em comprimento de onda de 412 nm (VASCONCELOS et al. 2007). A determinação dos níveis intracelulares de GSH foi realizada de acordo com a metodologia de Ellman (1959), com modificações (SCHALCHER et al. 2014). Baseado na capacidade que a GSH presente na amostra reduzir o composto ácido-5,5-ditiobis-2-nitrobenzóico (DTNB) para ácido nitrobenzóico (TNB).

Primeiramente foi preparado a solução de SOD e de DTNB, em seguida as amostras dos órgãos foram levadas ao vórtex depois deixadas em repouso, foi retirado 100  $\mu$ L concentrado de hemácias e adicionado a 900  $\mu$ L de água destilada, formando assim um hemolisado.

Tubos de ensaio foram devidamente identificados e neles adicionados 4mL de do tampão de SOD, 20  $\mu$ L de água destilada e 20  $\mu$ L da amostra que foram agitados no vórtex. Para o procedimento de leitura foram retirados 3 mL dessa amostra e colocadas na cubeta de leitura do espectrofotômetro, sendo lido a absorbância referente ao tempo 0 (T0). Seguidamente, foram adicionados 100  $\mu$ L do DTNB e iniciada a contagem do tempo de 3 minutos para realização da segunda leitura no tempo 3 (T3) (figura11). Para calcular a concentração de GSH na amostra foi utilizada a equação da curva padrão.

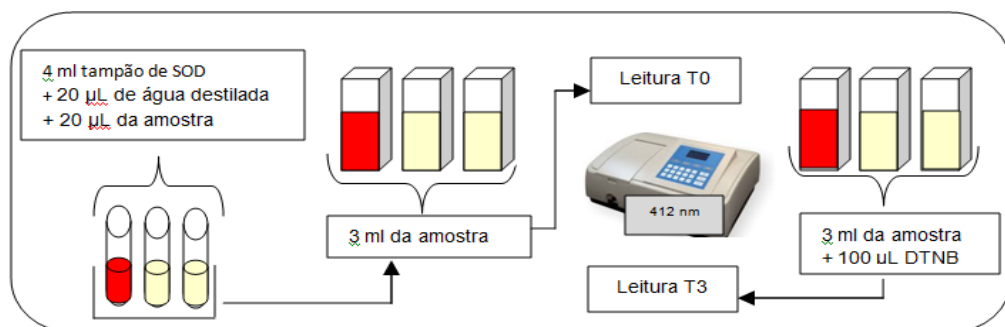


Figura 11. Esquema demonstrando os procedimentos para determinação da GSH intracelular



#### 4.8.4 Dosagem de Malondialdeído (MDA)

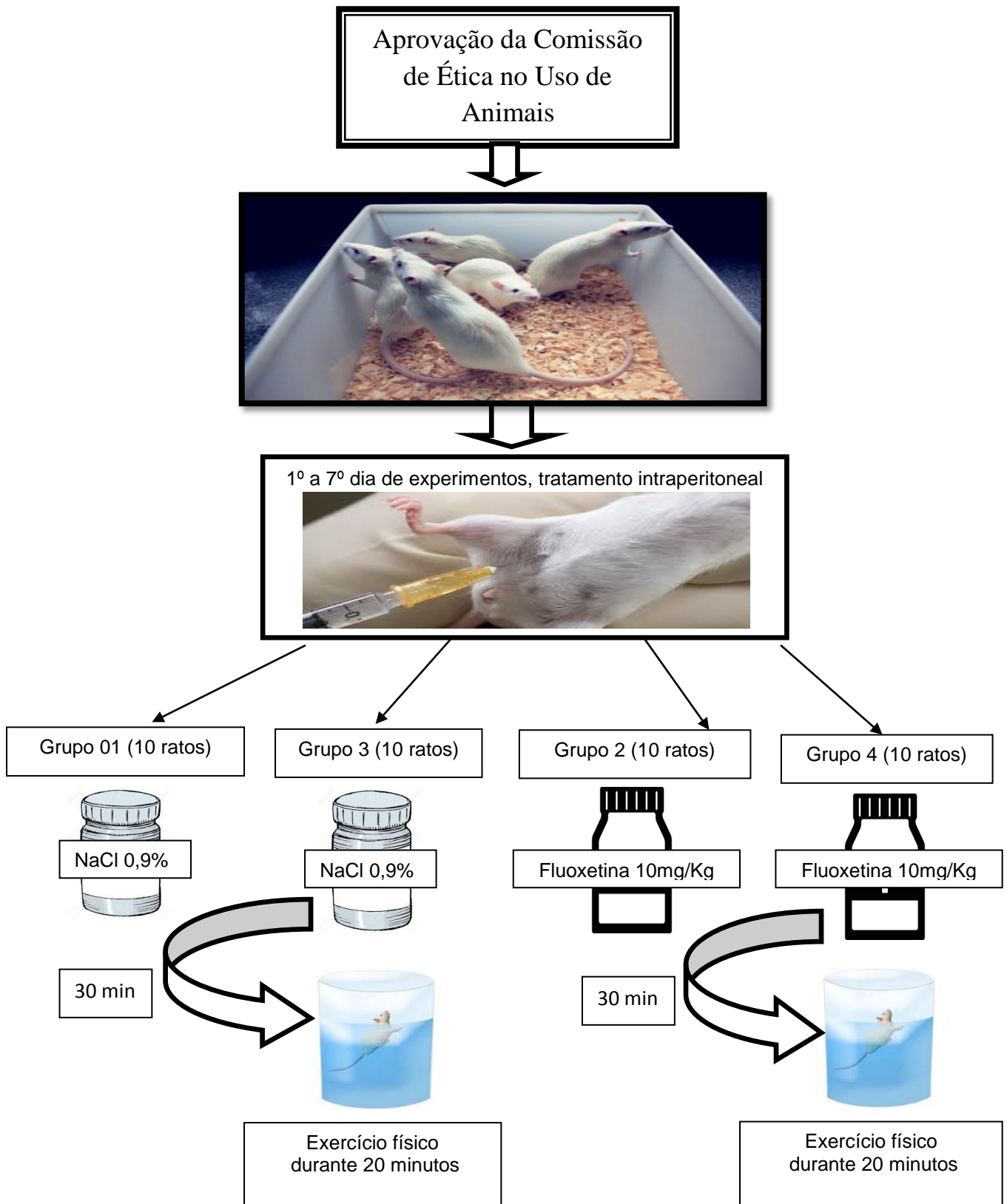
A dosagem de MDA é utilizada para avaliar a peroxidação lipídica e indicador de estresse oxidativo. A metodologia usada baseia-se na reação do MDA e outras substâncias com o ácido tiobarbitúrico, em pH baixo e temperatura elevada, formando o complexo MDA-TBA de cor rósea. A técnica utilizada foi de acordo com a metodologia de Percário et al. (1994).

Este método consistiu primeiramente na preparação da solução de fosfato monobásico 75 mM. Por meio da mistura de água acidificada em pH 2,5 mais fosfato monobásico de potássio ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  75 mM, Synth, 35210) levados a placa agitadora magnética até total dissolução. Depois a mesma foi utilizada na preparação da solução de TBA (10 mM) que usou-se 0,144g ácido tiobarbitúrico (TBA) (SIGMA®) 10 mM para formação do complexo TBA-MDA mais 100 ml da solução de fosfato monobásico de potássio, levados a placa agitadora magnética novamente até dissolver por completo (PERCÁRIO; VITAL; JABLONKA, 1994).

Em seguida foi adicionado primeiramente 1 ml da solução de TBA 10 mM mais 500  $\mu\text{L}$  das amostras da amostra em tubos de ensaio devidamente identificados organizados em estante e tampados com papel alumínio ao final da pipetagem. Para o tubo de controle branco e padrão foram adicionados 500  $\mu\text{l}$  de água destilada e 500  $\mu\text{l}$  de solução padrão de MDA 20  $\mu\text{M}$ . Em seguida, a estante com todos os tubos foram colocados em banho-maria à 94 °C durante 1 hora.

Após o banho-maria, as amostras foram resfriadas em temperatura ambiente durante 15 minutos. Observou-se nesta fase a coloração de tonalidade rósea proporcional à quantidade de MDA nas amostras. Na capela de fluxo laminar foi acrescentado 4 mL do reagente álcool n-butílico em cada tubo de ensaio e submetidos à homogeneização no vórtex. Em seguida esses tubos foram centrifugados em 2500 rpm durante 10 minutos. Então 3 ml do sobrenadante foi transferido para cubeta e lido em espectrofotômetro calibrado em 535 nm e zerado com o tubo controle branco. Utilizou-se como padrão o 1,1,3,3, tetrahidroxipropano (Sigma-Aldrich, T9889) para a realização da curva padrão.

### 4.9 Organograma dos experimentos

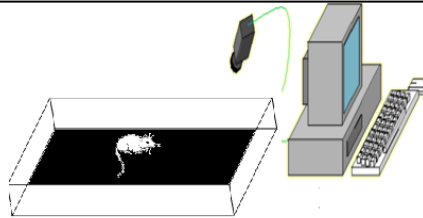


**8º DIA DE EXPERIMENTO**

**G1, G2 G3 e G4**



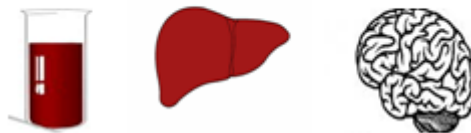
**Teste de Campo aberto**



**Labirinto em cruz elevado**



**Coleta de sangue e órgãos**



**GSH, TEAC, NO e MDA**

#### **4.10 Análise estatística**

Os dados foram submetidos à análise de variância de duas vias (two-way), seguida do post-hoc Bonferroni para a comparação de pares das médias e verificação da existência de diferença significativa em cada parâmetro e grupo analisados do início ao final do estudo. Os dados foram expressos como a média  $\pm$  erro padrão médio (e.p.m.) e foram considerados estatisticamente significativos para  $p \leq 0,05$ . Para análise estatística e construção dos gráficos foi utilizado o software GraphPad Prism 5.0.

## **5. RESULTADOS**

### **5.1 Testes comportamentais**

#### **5.1.1 Teste de campo aberto**

A atividade locomotora espontânea foi avaliada por meio do teste de campo aberto, neste avaliou-se 3 parâmetros: o número de levantamentos, entradas na área central e a distância total percorrida (figura 12). Na figura 12 A e C, respectivamente, observou-se que não houve diferença significativa no número de levantamento e distância total percorrida entre os grupos tratados com fluoxetina em animais expostos ou não ao exercício físico. A Figura 12 painel B mostra que os animais tratados com fluoxetina apresentaram redução no número de entradas na área central comparados aos animais sedentários tratados com salina. Além disso, observou-se que a prática de exercício físico não conseguiu reverter essa redução, que pode estar associado ao estresse ou à exaustão desses animais após o exercício físico.

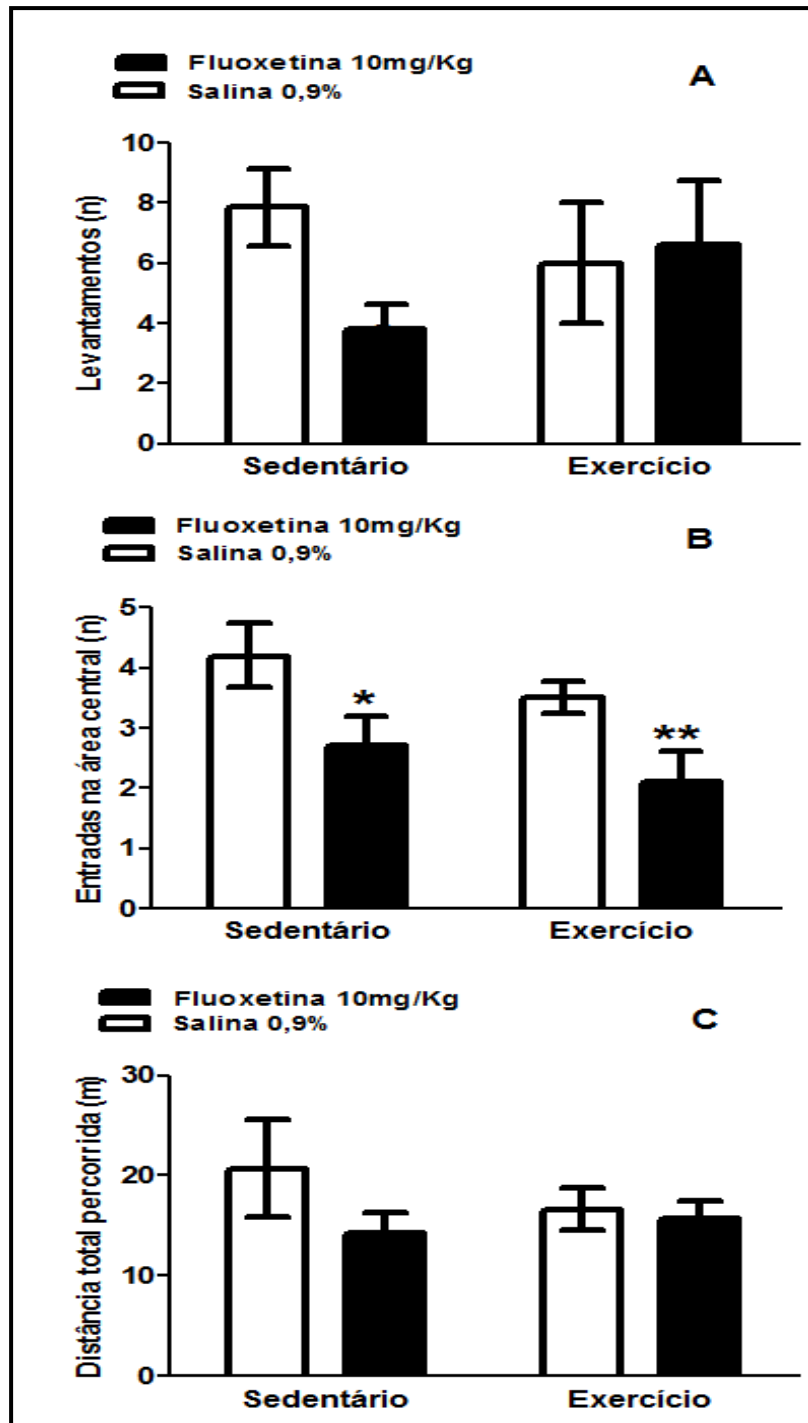


Figura 12. Efeito do tratamento subcrônico com fluoxetina em ratos adultos sedentários e submetidos ao exercício físico exaustivo sobre a locomoção espontânea no teste de campo aberto. O painel A representa número de levantamentos. Painel B representa número de entradas na área central. Painel C representa a distância total percorrida. Resultados expressos como a média  $\pm$  e.p.m. de 7-10 animais por grupo. Para a análise estatística foi realizado o teste ANOVA de duas via seguida do teste Bonferroni. \*Comparado ao grupo sedentário tratado com salina  $^*(p < 0,05)$  e  $^{**}(p < 0,01)$ .

### 5.1.2 Teste do labirinto em cruz elevado

No teste de labirinto em cruz elevado, avaliou-se o comportamento do tipo ansiedade, visto que é um dos testes de maior sensibilidade para esse tipo de comportamento. Dos parâmetros avaliados, observou-se que os animais tratados com fluoxetina e expostos ao exercício físico exaustivo apresentaram aumento significativo ( $p < 0,05$ ) nos percentuais de entrada no braço aberto (Figura 13 A) e no tempo no braço aberto (Figura 13B) em relação aos animais sedentários tratados com fluoxetina e aos animais expostos ao exercício físico e tratados com salina. Por outro lado, não houve diferença significativa entre os grupos no parâmetro número de entrada nos braços fechados (Figura 13C).

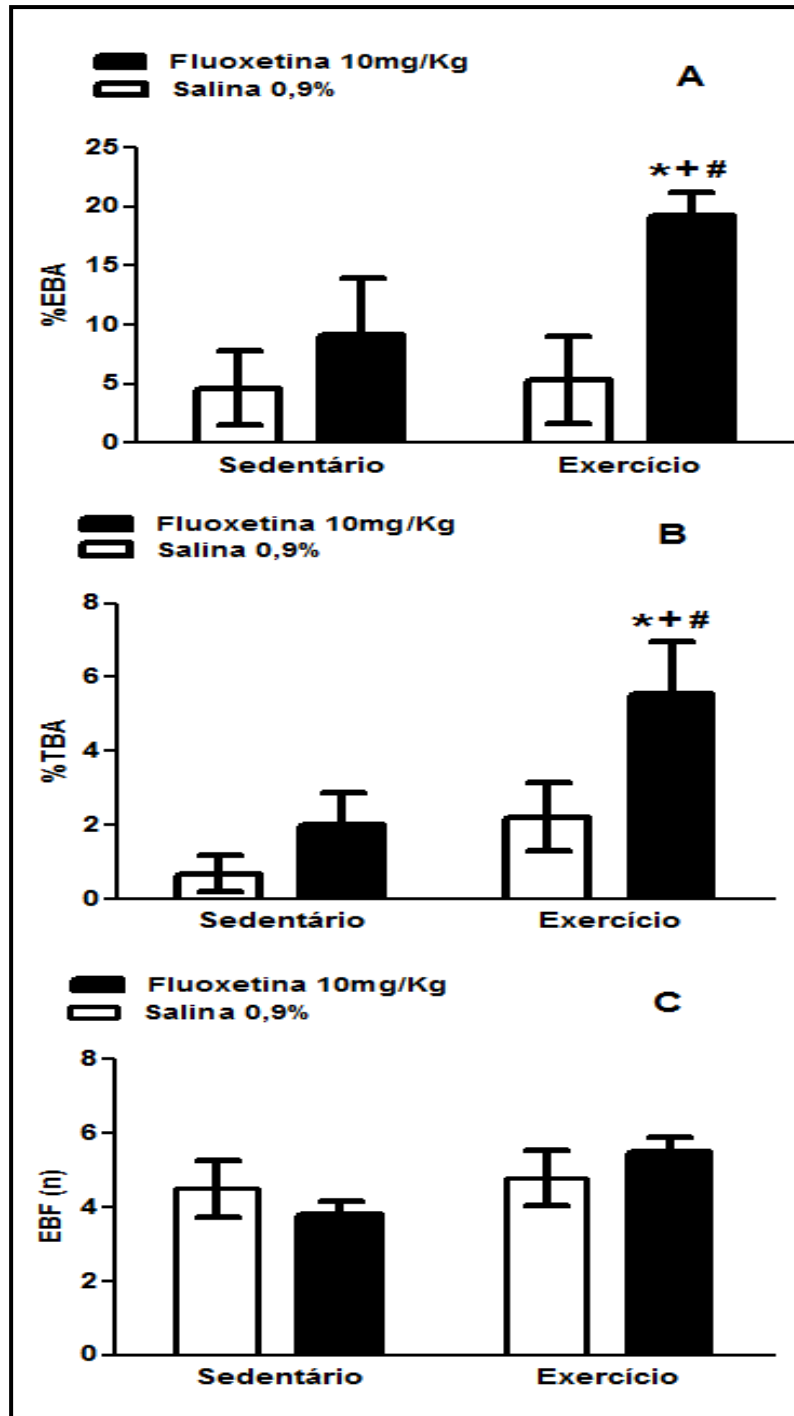


Figura 13. Efeito do tratamento subcrônico com fluoxetina em ratos adultos sedentários e submetidos ao exercício físico exaustivo no teste do labirinto em cruz elevado. Painel A % de entradas nos braços abertos. Painel B % de tempo nos braços abertos. Painel C número de entradas nos braços fechados. Resultados expressos como a média  $\pm$  e.p.m. entre 7-10 animais por grupo. \*comparado aos animais sedentários tratados com salina,  $(p < 0,05)$ . + comparado aos animais sedentários tratados com fluoxetina  $(p < 0,05)$ . #comparado aos animais tratados com salina e expostos ao exercício,  $(p < 0,05)$ . Teste ANOVA de duas via seguida do teste bonferroni.



## 5.2 Parâmetros oxidativos

### 5.2.1 Avaliação dos níveis de glutathiona (GSH) no sangue, cérebro e fígado

A GSH é um tripeptídeo que faz parte das defesas antioxidante celular (DICKINSON e FORMAN, 2002), podendo atuar diretamente na remoção de radicais livres ou como cofator de enzimas antioxidantes, como a GPx e a GST (MEISTER, 1982). Além disso, desempenha papel como anti-inflamatório e regulador metabólico (KIDD, 2000). A GSH também é um marcador da saúde celular e níveis baixos deste tripeptídeo levam a um aumento do estresse oxidativo no organismo, resistência às drogas e radiações e disfunção mitocondrial e, conseqüentemente, morte celular (JHA et al. 2000; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1985).

Nossos resultados demonstraram que o exercício físico exaustivo foi capaz de reduzir os níveis de GSH no sangue (Figura 14A), mas elevou a formação desse tripeptídeo no cérebro (Figura 14B) e não alterou seu nível no fígado (Figura 14C) comparado ao grupo sedentário tratado com salina. Tratamento com a fluoxetina também foi capaz de inibir os níveis de GSH no sangue dos animais sedentários e não alterou o efeito inibitório de GSH induzido pelo exercício físico (Figura 14A). Por outro lado, no fígado, o tratamento com fluoxetina elevou os níveis de GSH nos grupos fluoxetina sedentário e fluoxetina exposto ao exercício (Figura 14C). Enquanto no cérebro, a fluoxetina teve efeito dual, visto que, aumentou os níveis de GSH nos animais fluoxetina sedentário, mas inibiu parcialmente os níveis de GSH induzido pelo exercício (Figura 14B).

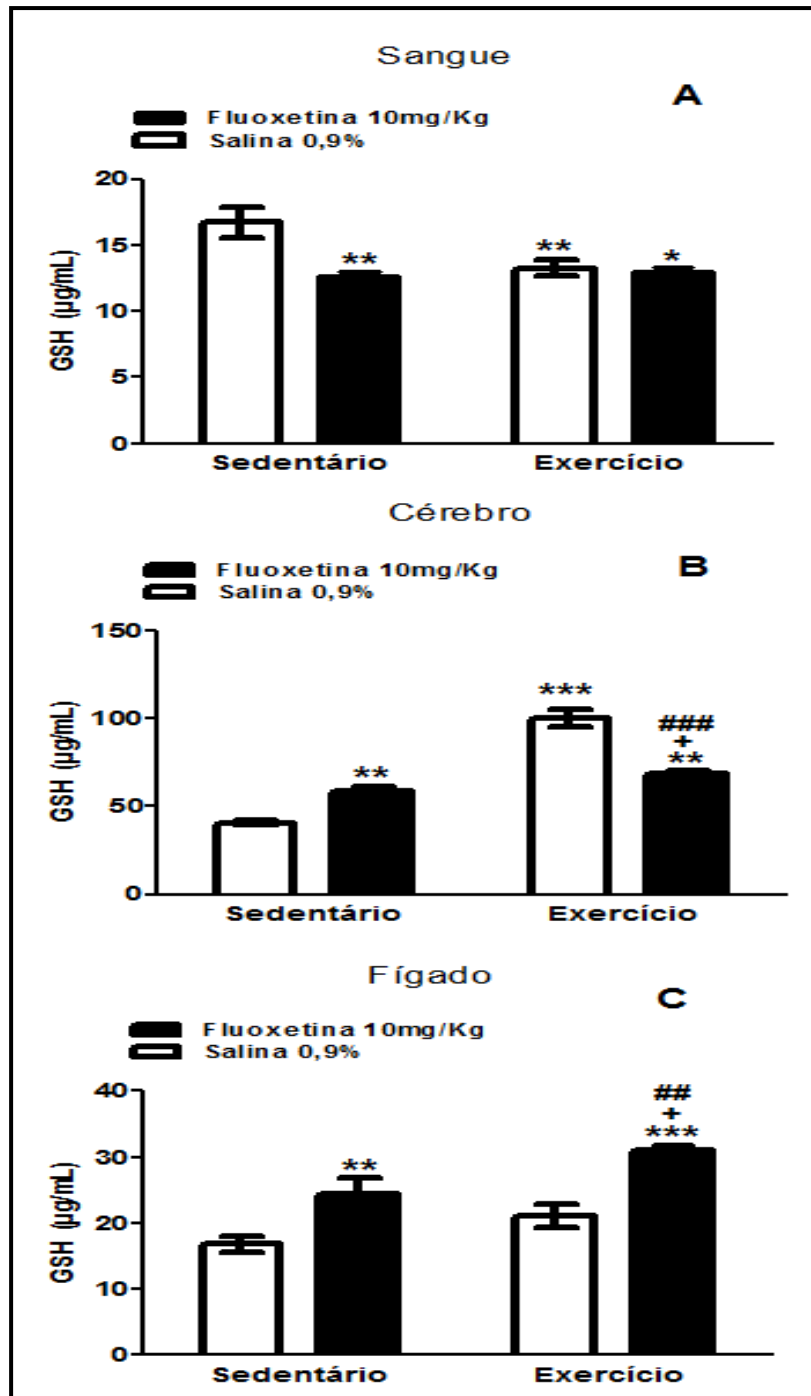


Figura 14. Efeito do tratamento subcrônico com fluoxetina em ratos adultos sedentários e submetidos ao exercício físico exaustivo na produção de GSH. Painel A determinação no sangue, painel B determinação no cérebro e painel C determinação no fígado. Resultados expressos como a média  $\pm$  e.p.m. entre 7-10 animais por grupo. \*comparado aos animais sedentários tratados com salina,  $(p < 0,05)$ . \*\* $(p < 0,01)$  e \*\*\* $(p < 0,001)$ . + comparado aos animais sedentários tratados com fluoxetina  $(p < 0,05)$ . # comparado aos animais tratados com salina e expostos ao exercício, ## $(p < 0,01)$  e ### $(p < 0,001)$ . Teste ANOVA de duas via seguida do teste Bonferroni.

### **5.2.2 Avaliação da capacidade de antioxidante total pelo método de TEAC no sangue, cérebro e fígado**

Outro fator antioxidante avaliado foi a capacidade antioxidante total pelo método de TEAC, no qual observou-se que no sangue não houve alterações significativas neste parâmetro em nenhum dos grupos avaliados (Figura 15A). No entanto, no cérebro, o tratamento com fluoxetina nos animais sedentários e expostos ao exercício físico foi capaz de reduzir os níveis de TEAC comparados os animais sedentários tratados com salina (Figura 15B). No fígado, apenas os animais sedentários tratados com fluoxetina apresentaram redução nos níveis de TEAC, mostrando que o exercício físico não altera os níveis dos antioxidantes totais neste órgão.

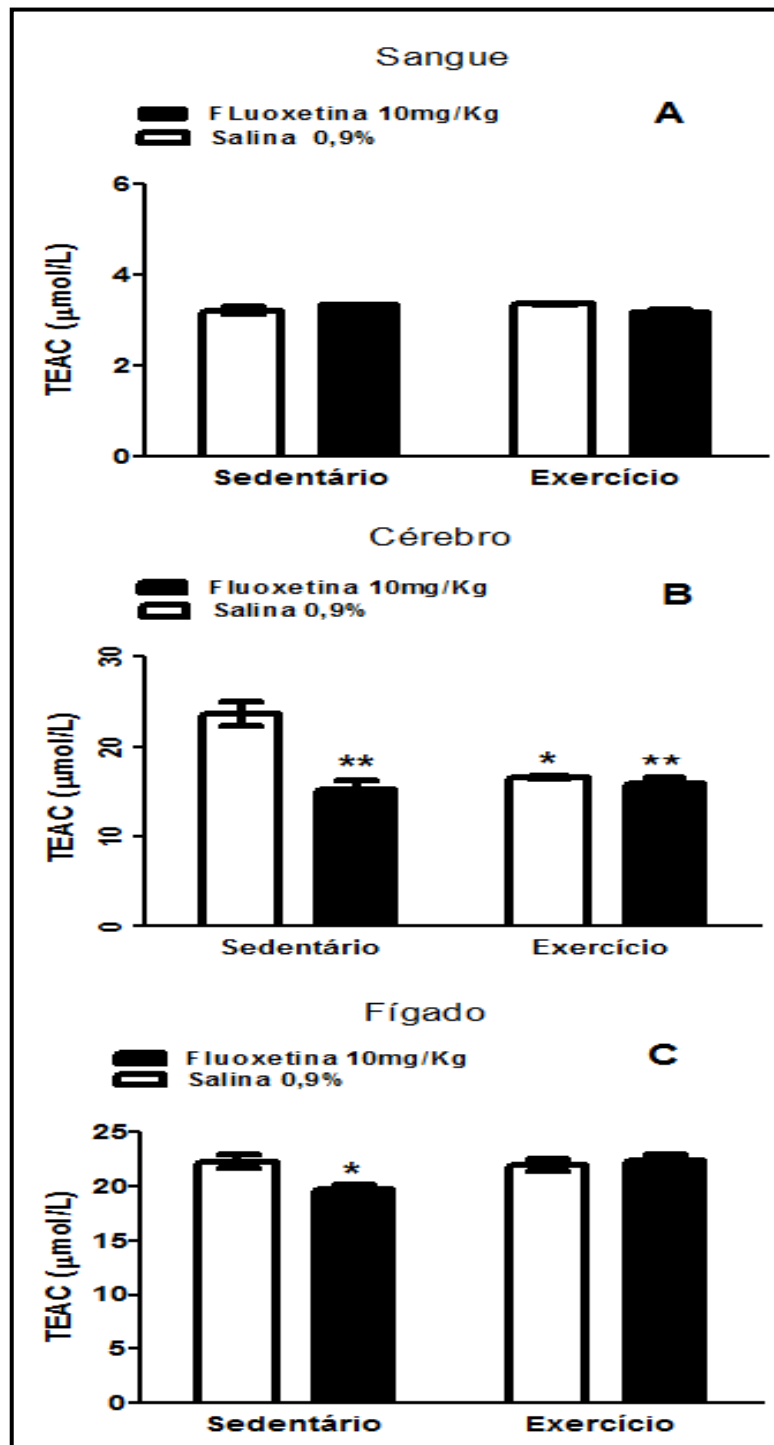


Figura 15. Efeito do tratamento subcrônico com fluoxetina em ratos adultos sedentários e submetidos ao exercício físico exaustivo na produção do TEAC. Painel A determinação no sangue, painel B determinação no cérebro e painel C determinação no fígado. Resultados expressos como a média  $\pm$  e.p.m. entre 7-10 animais por grupo. \*comparado aos animais sedentários tratados com salina, \*( $p < 0,05$ ) e \*\*( $p < 0,01$ ). Teste ANOVA de duas via seguida do teste bonferroni.

### **5.2.3 Avaliação dos níveis de óxido nítrico (NO) no sangue, cérebro e fígado**

Os resultados obtidos após tratamento com fluoxetina e associado ao exercício físico exaustivo em relação aos níveis do NO presente no plasma, cérebro e fígado estão apresentados na Figura 16, painel A, B e C respectivamente. Neste observou-se que o exercício físico aumentou os níveis de NO sangue e no fígado, mas não no cérebro. O tratamento com fluoxetina elevou os níveis de NO no sangue de animais sedentários, porém nos animais expostos ao exercício físico, o tratamento com a fluoxetina foi capaz de inibir parcialmente a produção desse mediador induzido pelo exercício no sangue (Figura 16A). Por outro lado, no fígado, percebe-se que tratamento com fluoxetina potencializou a produção do NO induzido pelo exercício físico exaustivo (Figura 16B). No entanto, no cérebro, de maneira geral, os grupos não apresentaram alterações nos níveis de NO, com exceção dos animais tratados com fluoxetina e expostos ao exercício físico que apresentaram redução nos níveis de NO quando comparado aos outros grupos (Figura 16C).

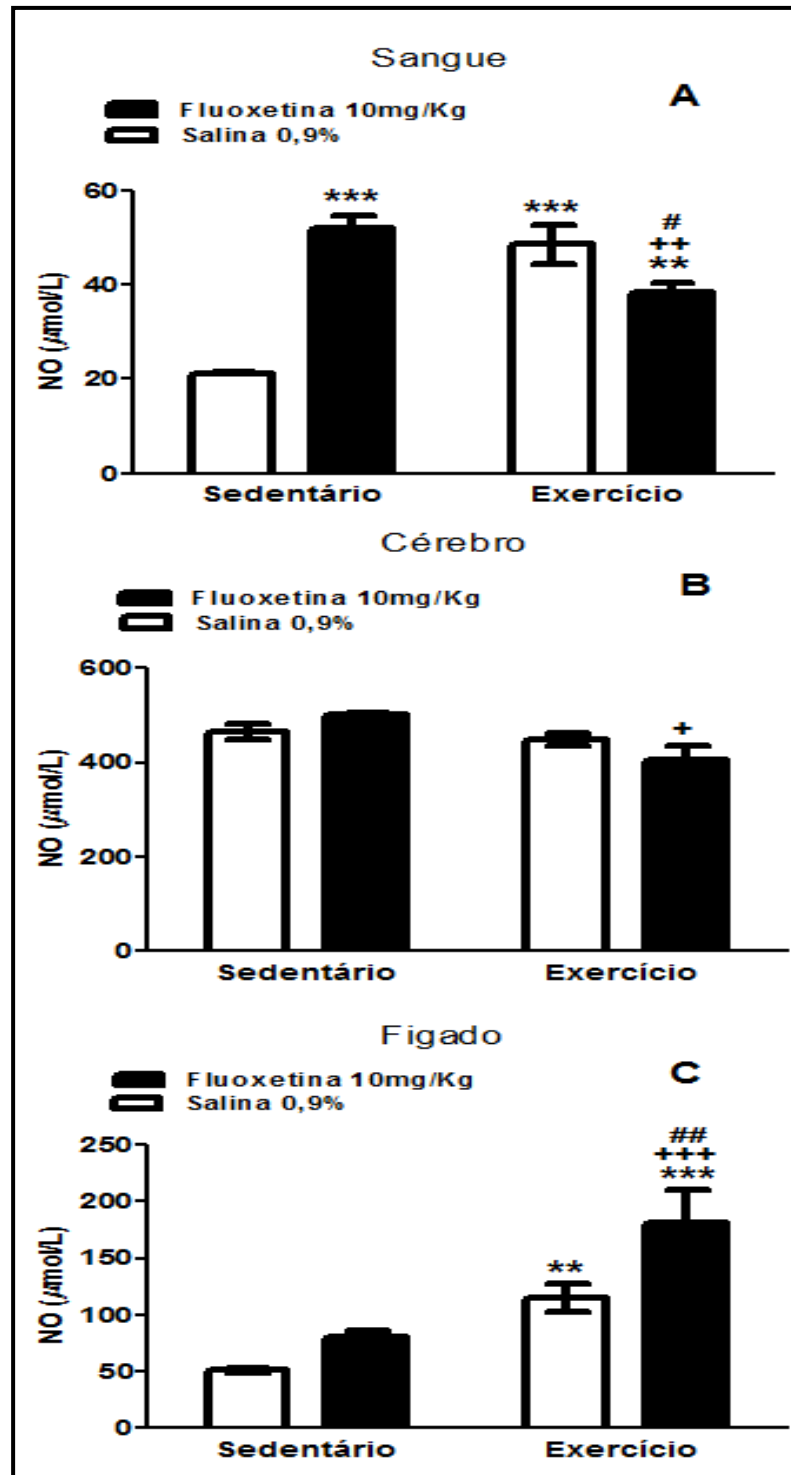


Figura 16. Efeito do tratamento subcrônico com fluoxetina em ratos adultos sedentários e submetidos ao exercício físico exaustivo na produção do NO. Painel A determinação no sangue, painel B determinação no cérebro e painel C determinação no fígado, Resultados expressos como a média  $\pm$  e.p.m. entre 7-10 animais por grupo. \*comparado aos animais sedentários tratados com salina, \*\*( $p < 0,01$ ) e \*\*\*( $p < 0,001$ ). + comparado aos animais sedentários tratados com fluoxetina +( $p < 0,05$ ), ++( $p < 0,01$ ) e +++( $p < 0,001$ ). #comparado aos animais tratados com salina e expostos ao exercício, #(p < 0,05) e ##(p < 0,01). Teste ANOVA de duas via seguida do teste bonferroni.

#### **5.2.4 Avaliação dos níveis de malonaldeído (MDA) no sangue, cérebro e fígado**

Em relação a produção de MDA, no sangue, o exercício físico exaustivo promoveu o aumento nos níveis de MDA comparado aos animais sedentários tratado com salina (Figura 17A), porém não houve alterações no cérebro e no fígado (Figura 17B e C). No entanto, o tratamento com fluoxetina induziu a formação de MDA nos animais sedentários e nos expostos ao exercício físico, mostrando este fármaco levou ao estresse oxidativo no sangue dos animais (Figura 17A). No fígado, somente os animais tratados com fluoxetina e expostos ao exercício físico apresentaram níveis elevados de MDA, mostrando que a associação da fluoxetina e exercício físico induziu o estresse oxidativo (Figura 17C). No entanto, no cérebro, os animais tratados com a fluoxetina tanto os sedentários quanto os expostos ao exercício físico apresentaram níveis reduzidos de MDA comparados aos animais tratados com salina, mostrando que a fluoxetina no cérebro apresentou efeito antioxidante (Figura 17B).

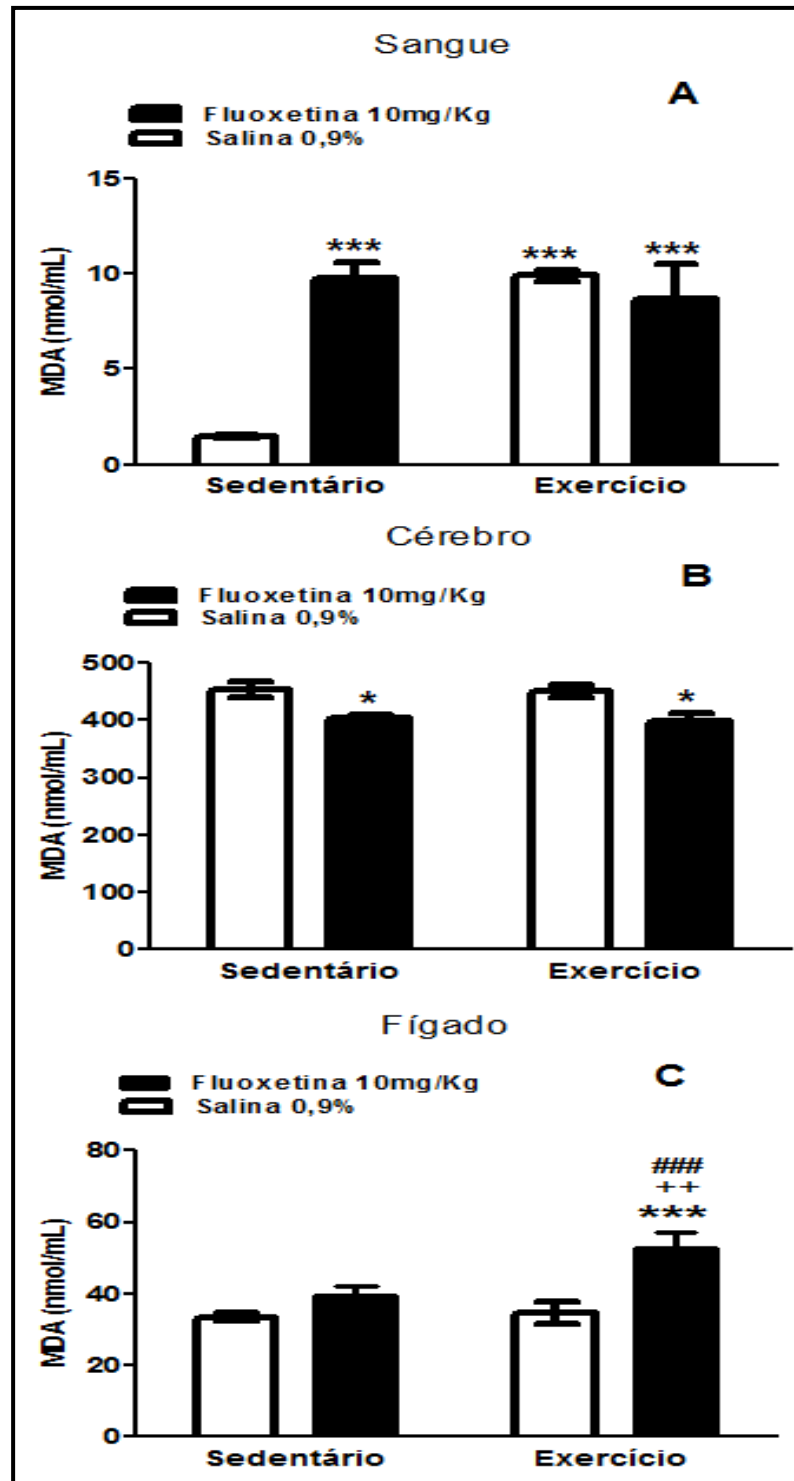


Figura 17. Efeito do tratamento subcrônico com fluoxetina em ratos adultos sedentários e submetidos ao exercício físico exaustivo na produção do MDA. Painel A determinação no sangue, painel B determinação no cérebro e painel C determinação no fígado, Resultados expressos como a média  $\pm$  e.p.m. entre 7-10 animais por grupo. \*comparado aos animais sedentários tratados com salina, \*( $p < 0,0$ ) e \*\*\*( $p < 0,001$ ). + comparado aos animais sedentários tratados com fluoxetina, ++( $p < 0,01$ ). # comparado aos animais tratados com salina e expostos ao exercício, ###( $p < 0,001$ ). Teste ANOVA de duas via seguida do teste bonferroni.



## 6. DISCUSSÃO

Este estudo teve como objetivo investigar o efeito subcrônico (tratamento durante 7 dias i.p.) da fluoxetina (10mg/kg/dia) em ratos adultos submetidos ao exercício físico exaustivo (nado forçado durante 20 minutos/dia), nos comportamentos do tipo locomoção espontânea pelo método de TCA, comportamento semelhante a ansiedade por LCE, assim como a avaliação de parâmetros oxidativos nas amostras sanguíneas e teciduais destes animais.

A fluoxetina e o exercício físico exercem efeitos semelhantes sobre o sistema serotoninérgico, promovendo o aumento da disponibilidade de serotonina no SNC, (LAN et al. 2014; MEEUSEN et al. 1996). O exercício físico pode trazer vários benefícios ao organismo quando praticado moderadamente, porém quando exaustivo pode ser um fator importante para provocar múltiplas mudanças nos níveis metabólico e fisiológico inclusive no SNC associado à serotonina. Este tipo de exercício é conhecido por induzir uma situação de estresse oxidativo, perda de energia, distúrbios do humor, perda de apetite, fadiga e lesão tecidual, como danos musculares (ARMSTRONG, et al. 1983; RADAK, et 2008). Diante disso, a serotonina que pode atuar como vasoconstritor cerebral e tem seus níveis de atividade serotoninérgica oscilando durante exercício prolongado, o que está sendo centro de interesse crescente no papel como fator chave no retardamento ou indução do esgotamento físico (SUNG, et al. 2011; SEO, et al. 2011; RHIM, et al. 2007).

De acordo com os nossos dados, observa-se que os animais tratados com fluoxetina apresentaram redução no parâmetro número de entradas na área central, com diferença significativa entre os grupos tratados com fluoxetina e os tratados com salina. Os resultados mostraram que não houve danos na locomoção desses animais, visto que, esse parâmetro é mais utilizado para avaliar o comportamento semelhante à ansiedade (KARL; PABST; VON HÖRSTEN, 2003). Além disso, o local de realização do teste era iluminado com luzes brancas que pode ter motivado que esses animais esquivassem da área central.

A curiosidade do animal em explorar novos ambientes no TCA, pode ser um indicativo de atividade locomotora espontânea, tanto vertical quanto horizontal (KARL et al. 2003). No nosso trabalho, o número de levantamentos e a distância total percorrida não apresentaram resultados significativos, apenas o parâmetro número de entradas na área central apresentou redução na locomoção, o que pode ser indicativo de estresse nesses animais, já que, a elevação do número de imobilidade no aparato pode ser considerada indicativo de alto grau de estresse (KARL et al. 2003; BAHÍ 2013).

Dulawa et al. (2004) demonstraram que ocorreu redução na locomoção espontânea no teste de TCA, em ratos adultos tratados cronicamente por 24 dias com fluoxetina 10mg/kg/dia. Com isso, esses autores sugerem que essa redução na atividade locomotora pode ser confundida com outras medidas comportamentais que tentam avaliar os efeitos ansiolíticos ou antidepressivos da fluoxetina, como por exemplo, estresse e ou medo em deambular e em explorar mais locais abertos. Esses resultados foram similares aos nossos dados, embora neste estudo tenha sido usado outro modelo de intoxicação e duração de tratamento diferente. Neste estudo de Dulawa et al. (2004) também foi observado no teste de TCA, que o tratamento subcrônico (4 dias) e crônico (24 dias) com a fluoxetina levou a redução no número de entradas no centro, na distância total percorrida no centro, e no tempo na área central, não alterou a atividade locomotora dos animais.

Mediante os nossos resultados, sugere-se que o aumento de imobilidade ou redução na locomoção dos ratos na área central do teste de campo aberto pode ter sido estresse causado pela fluoxetina que faz parte dos ISRS, fármaco que favorece o aumento da disponibilidade de 5-HT, por sua vez, pode amplificar suas ações em seus múltiplos receptores nas várias regiões cerebrais. Nesse sentido, Deakin e Graeff (1991) sugeriram que em situações de ameaça potencial, projeções serotoninérgicas do núcleo dorsal da rafe (NDR) à amígdala e ao córtex pré-frontal podem estar associadas a comportamentos passivos de defesa. Com isso, as projeções serotoninérgicas inibitórias do NDR à MCPAd ocasionam inibição das respostas ativas da fuga, que estão relacionadas ao pânico e a uma menor

exploração do ambiente (GRAEFF e ZANGROSSI, 2010; GRAEFF, 2003; POBBE e ZANGROSSI, 2005; POBBE et al. 2011).

Em estudos de Blanchard e Blanchard (1994) foi demonstrado redução dos parâmetros de locomoção, que pode ser explicado pelo fato de que os animais mesmo preferindo o ambiente novo, está novidade pode provocar reações defensivas semelhantes às situações ameaçadoras a estes animais, podem gerar conflito entre a curiosidade e o medo da novidade. Desta forma, o teste de campo aberto é um paradigma clássico de abordagem em que o ambiente provoca simultaneamente ansiedade e desejo de exploração cautelosa pelo ambiente novo (WELKER, 1957 ; BELZUNG e LE PAPE, 1994 ; DULAWA et al. 1999 ; PRUT e BELZUNG, 2003 ).

Diante do contexto, estudos sobre a ação da fluoxetina e exercício físico nos testes comportamentais ainda são escassos. Além disso, a maioria das pesquisas mostram a ação da fluoxetina no TCA como medida dos comportamentos semelhantes a depressão e ansiedade em roedores. Em relação aos receptores serotoninérgicos não se tem claro qual receptor e área cerebral podem estar envolvidos diretamente com danos na locomoção, já que é um conjunto de estrutura e funções complexas envolvidas no sistema motor.

O comportamento semelhante ansiedade foi analisado por meio do teste labirinto em cruz elevado, que é baseado na aversão natural de roedores a espaços abertos, avaliando-se o conflito entre a exploração e aversão a este tipo de lugar. Os perfis de comportamento provocados neste teste são semelhantes aos de neofobia, exploração e a aproximação/evitar conflitos, assim o aparelho é muitas vezes referido como um modelo de conflito comportamental espontâneo não-condicionado (BOURIN et al. 2007). Em nosso estudo, os principais índices de ansiedade analisado neste teste (% entradas nos braços abertos e % tempo gasto nos braços abertos) apresentaram-se aumentados, caracterizando uma diminuição da ansiedade dos animais tratados com fluoxetina e exposto ao exercício físico exaustivo. No entanto, sem afetar a frequência de entradas nos braços fechados, parâmetro que avalia a atividade locomotora destes animais expostos ao LCE (CRUZ et al. 1994; FILE, 1992; RODGERS e JOHNSON, 1997).

Rogoz e Skuza, (2011) realizaram estudos com ratos wistar machos no LCE, e utilizaram como tratamento os medicamentos olanzapina, risperidona e a fluoxetina, que foi administrada em dose baixa (2,5 mg/kg). A fluoxetina nesta dose não induziu atividade ansiolítica no teste, porém quando utilizadas nas doses mais elevadas (5 ou 10 mg/kg) aumentaram significativamente o tempo gasto nos braços abertos (até 37,7 ou 70,5%) e a porcentagem de entradas nos braços abertos (até 51,1 ou 68,0%, respectivamente, demonstrando efeito ansiolítico da fluoxetina nas doses maiores. Esses resultados foram similares aos nossos, que apesar de apresentarem cronogramas de tratamentos diferentes, ressalta-se o efeito ansiolítico da fluoxetina.

Nos estudos de Morgan et al. (1973), relatam que homens considerados normais foram expostos durante 15 minutos de corrida até a exaustão, demonstrando redução nos níveis de ansiedade, após o termino do exercício. Esses resultados e vem contribuir com a nossa pesquisa, mesmo apresentando protocolos diferentes de exercício e de espécies. De acordo com O'connor et al. (1995), o nível de ansiedade aumenta durante os primeiros 5 minutos de exercício físico exaustivo e só apresentam redução após 10 a 15 minutos da sua realização, resultado que corroborar aos nossos dados.

Alguns estudos relatam também que a ansiedade está relacionada com estruturas cerebrais localizadas no sistema límbico, que é modulado pelas projeções do tronco encefálico através de vias serotoninérgicas e dopaminérgicas (MOSER et al. 1993). O sistema límbico recebe conexões aferentes em praticamente todo o sistema nervoso e pode ser considerado como centro de controle das emoções, constituído de estruturas nucleares ricas em neuropeptídeos e estruturas adjacentes que contém monoaminas, tais como: noradrenalina, dopamina e serotonina (BANNERMAN et al. 2004).

A ação da fluoxetina ocorre ao retardar a recaptação da serotonina, promovendo o aumento dos níveis e do tempo desse neurotransmissor nas sinapses. Este fármaco também altera as funções dos seus diversos receptores serotoninérgicos (HIEMKE e HARTTER, 2000). Em especial o 5-HT<sub>1A</sub> que é um

subtipo de receptor que regula a taxa de disparo de neurônios serotoninérgicos, assim como atua como um auto-receptor inibitório de serotonina e pode mediar o disparo neuronal induzido por serotonina (SPROUSE E AGHAJANIAN 1987; ASHBY et al. 1994 ). Nesse sentido, o hipocampo é uma área neuronal associada a memória e é um dos principais centros de informação e de regulação dos comportamentos (BANNERMAN et al. 2004). Essa área cerebral recebe inervações serotoninérgicas dos núcleos dorsal e mediano da rafe (AZMITIA e SEGAL, 1978; VERTES, 1991) e possui altas concentrações de receptores 5-HT<sub>1A</sub> (HOYER et al. 1986; LAPORTE et al. 1994; PAZOS et al. 1987).

Além disso, vários autores relataram que a ativação do 5-HT<sub>1A</sub> produz efeitos ansiolíticos no núcleo mediano da rafe (FILE et al. 1996; FILE E GONZALEZ, 1996) e no hipocampo dorsal (MENARD e TREIT, 1998), e ansiogênico em outras estruturas cerebrais, tais como, núcleos dorsal da rafe, amígdala e basolateral da amígdala ou septo (ZANGROSSI e GRAEFF, 1994; FILE e GONZALEZ; MENARD e TREIT, 1998), em ratos. Segundo Deakin e Graeff (1991), a serotonina parece exercer ações diferentes em relação à ansiedade, visto que, dependendo do estímulo aversivo (condicionado ou incondicionado), este mediador pode atuar como ansiolítico ou ansiogênico. Com isso, a serotonina pode facilitar ou refrear o comportamento defensivo, dependendo dos subtipos de receptores serotoninérgicos e dos sítios em que atua no SNC, visto que há várias projeções serotoninérgicas distribuídas por diferentes regiões cerebrais (GRAEFF et al. 1996).

A exposição ao LCE pode se tratar de uma situação aversiva incondicionada, resultando na estimulação de vias serotoninérgicas do SNC com projeções para estruturas como, amígdala, septo, hipotálamo, MCPd e hipocampo. O aumento dos estímulos nos neurônios serotoninérgicos da rafe com projeções para amígdala desencadeado por estímulos aversivos condicionados, podendo resultar em facilitação do comportamento defensivo via ativação de receptores 5-HT<sub>2A/2C</sub> e 5-HT<sub>3</sub> causando um efeito ansiogênico (RODGERS et al. 1992). Por outro lado, o aumento da liberação de serotonina na MCPd mesencefálica provocado por estímulos aversivos incondicionados resulta na diminuição das respostas fisiológicas e comportamentais relacionadas ao medo, em ratos, provavelmente via receptores

5-HT<sub>2A/2C</sub> e 5-HT<sub>1A</sub> promovendo efeito ansiolítico (DEAKIN e GRAEFF, 1991; GRAEFF et al. 1996).

Desta forma, Santos, (2012) relata que o LCE é um modelo animal amplamente utilizado para verificação do comportamento semelhante a ansiedade que se baseia em duas tendências conflitantes, incluindo o impulso do roedor para explorar um ambiente novo e sua aversão aos espaços abertos. Assim, animais ansiosos passarão a maior parte do tempo nos braços fechados, enquanto animais menos ansiosos explorarão as áreas abertas por um longo período de tempo (PELLOW et al. 1985). Diante dos fatos, observa-se que o nosso resultado apresentou a diminuição do comportamento semelhante a ansiedade nos ratos tratados com fluoxetina e expostos exercício físico no LCE. Nesse sentido, o exercício físico e a fluoxetina são reconhecidamente ativadores do sistema serotoninérgico e podem induzir estresse oxidativo nos variados tecidos, principalmente no SNC. Com isso, este efeito tipo ansiolítico pode estar associado ao aumento de estímulos nas vias serotoninérgicas com projeções para o hipocampo dorsal, tecido que contém altas concentrações de receptores 5-HT<sub>1A</sub> e são responsáveis pelo efeito ansiolítico de alguns fármacos (HOYER et al. 1986; PAZOS et al. 1987; LAPORTE et al. 1994). Desta forma, houve a necessidade de investigar os efeitos do tratamento com fluoxetina em animais submetidos ao exercício físico exaustivo, a fim de verificar os efeitos dos parâmetros oxidativos em tecidos como sangue, cérebro e fígado.

Uma vez que, durante o exercício físico exaustivo aumento no consumo de oxigênio estimula as atividades das mitocôndrias e dos linfócitos, apresentando como resultado a produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (JACKSON, et al. 2007; SACHDEV e DAVIES, 2007). Essas espécies em um sistema equilibrado são responsáveis pela regulação celular da expressão gênica e sinalização celular. Porém essas espécies reativas em níveis elevados no organismo causam o desequilíbrio do sistema redox e conseqüentemente tornam-se destrutivos para as células e tecidos, (WITHEE, et al. 2017; NIE, et al. 2011). Vários estudos mostram a fluoxetina e o exercício físico pode induzir estresse oxidativo ocasionando danos em macromoléculas, provocando mudanças em níveis

metabólico e fisiológicos no organismo (TANNER, 2002; CAMPANELLA et al. 2005; SUZUKI et al. 2007; HARRISON et al.1991).

Sabe-se que os eritrócitos são transportadores de oxigênio na circulação e são vulneráveis ao dano oxidativo ao longo de sua vida útil, devido à alta concentração celular de oxigênio e hemoglobina, que aceleram o processo oxidativo (SEN, 1999). Além disso, essas células estão constantemente expostas a um grande número de oxidantes derivados de várias fontes endógenas e exógenas durante o processo de exercício exaustivo. Ciana et al. (2004) sugeriram que os níveis de GSH intracelulares protegem glóbulos vermelhos de lesões induzidas por ROS, com isso, seus sistemas celulares são incapazes de reduzir os fatores oxidantes, devido aos baixos níveis de GSH livre, resultando muitas vezes em degeneração irreversível e morte celular ( ZIPSER et al. 1997).

Nesse contexto, a fluoxetina e o exercício físico estão associados a um aumento da absorção de O<sub>2</sub> nos músculos contrácteis e ação do metabolismo mitocondrial oxidativo, induzindo a liberação de ROS mitocondrial (VIINA et al. 2000). Com isso, o estresse oxidativo relacionado ao exercício pode aumentar a liberação de íons de ferro em fluídos extracelulares e plasma durante e após o exercício, embora por mecanismos ainda não conhecido. Nos estudos realizados por Sastre et al. (1992) e revisados posteriormente por Vina et al. (2000) comprovaram que somente no exercício exaustivo há indução significativa de estresse oxidativo, ao encontrarem relação linear entre concentrações sanguíneas de lactato e de glutathiona oxidada durante o exercício. Além do mais, níveis elevados de lactato podem contribuir para a oxidação excessiva de GSH comprometendo assim as defesas antioxidantes e gerar estresse oxidativo (SUREDA et al. 2009).

Os níveis de GSH no cérebro dos animais tratados com fluoxetina e expostos ao exercício físico exaustivo se apresentam maiores em relação aos animais sedentários e menor em relação aos expostos ao exercício físico tratados com salina. Isso nos mostra como o cérebro é bastante sensível a quaisquer alterações da homeostasia da GSH, essa sensibilidade pode ser explicada pela hipótese de que esse tripeptídeo funciona como neuromodulador ou neurotransmissor no cérebro (DRINGEN, 1999; BALLATORI, 2009). Desta forma, a redução de GSH

pode ter sido causada pelo tratamento com a fluoxetina, visto que as concentrações e atividade da GSH no cérebro são pequenas em relação aos outros órgãos e tecidos. Sendo assim, essa redução pode ser consequência da baixa de atividade específica de GSH em neurônios, tornando o cérebro mais suscetível à ação da fluoxetina e do exercício físico exaustivo que provoca a homeostase no cérebro (BALLATORI, 2009; BERNARD, 2008).

Moretti et al. (2012) submeteu camundongos ao estresse e encontrou uma redução na atividade da enzima GR que pode estar relacionada à ação antioxidante da glutatona, essa diminuição foi especialmente no hipocampo, córtex, indicando uma mudança no sistema de defesa antioxidante no sistema nervoso desses animais. Por outro lado, Abdel-Salam et al. (2013), encontraram aumento nos níveis de GSH no cérebro, em especial no hipocampo dos animais tratados com fluoxetina em doses de 10 e 20mg/kg. Diante desses fatos, sugere-se que a fluoxetina pode induzir elevação nos níveis de GSH no cérebro, mostrando que este fármaco pode ter ação antioxidante neste tecido. Tal fato pode estar associado ao SNC ter capacidade de adaptação metabólica, fornecendo unidades de GSH livre que mantém o equilíbrio redox positivo durante o exercício físico e uso de fluoxetina (SAKR et al. 2015).

Observou-se que no fígado apresentam níveis maiores de GSH nos grupos tratados com fluoxetina, mostrando possivelmente que este fármaco induziu a diminuição dos radicais livres neste órgão. A pesquisa de Djordjevic et al. (2011) contribuiu com os nossos dados, pois também ocorreu um aumento nos níveis de GSH no fígado de ratos submetidos a estresse crônico e tratado com fluoxetina. Com isso, estes autores afirmam que o aumento de antioxidantes pode servir como um indicador de aumento de danos oxidativos no tecido hepático, causado por estímulos adversos, tais como o tratamento com fluoxetina e o exercício físico. No entanto, o aumento dos fatores antioxidantes pode reduzir a produção de ROS em linfócitos, granulócitos e monócitos, diminuindo assim o estresse oxidativo periférico (RAMMAL et al. 2008).

Outra explicação para o aumento dos níveis de GSH no fígado dos animais tratados com fluoxetina e expostos ao exercício físico, é que no sistema redox da



GSH, a enzima GPx apresenta alta atividade no fígado, moderada no cérebro, e baixa nos músculos (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1989). A quantidade e atividade dessa enzima variam entre diferentes espécies, bem como de entre tecidos em uma mesma espécie (MANNERVIK, 1985). Além disso, o rim e fígado estão expostos vários xenobióticos, logo é admitido que estes órgãos apresentem altos níveis de GSH, pois tem papel crucial na desintoxicação de substâncias tóxicas orgânicas e inorgânicas no organismo (ANDERSON, 1998).

Outra medida analisada no sangue e nos tecidos por meio do método de TEAC foi a capacidade de antioxidante total, que representa a ação simultânea de todos os antioxidantes presentes em uma amostra, pode ser utilizado como marcador para detectar mudanças no estresse oxidativo (GHISELLI et al. 2000). No entanto, não possui especificidade para determinar alterações em atividade enzimáticas. Em nosso estudo, os níveis de TEAC no sangue não estavam alterados, porém os níveis de GSH estavam reduzidos nos grupos tratados com fluoxetina e os expostos ao exercício físico exaustivo. A ausência de diferenças significadas na capacidade antioxidante total no sangue pode estar relacionada aos níveis normais de proteínas plasmáticas, como ceruloplasmina, transferrina, ácido úrico e pequenas moléculas antioxidantes como vitaminas C e E, (RAHMAN et al. 2000).

No cérebro, todos os animais tratados com fluoxetina e expostos ao exercício físico apresentaram níveis reduzidos na capacidade antioxidante total. Essa diminuição pode ter ocorrido em razão do SNC ser mais sensível aos danos oxidativos, pois apresenta grande atividade enérgica mitocondrial dependente de oxigênio, associada a alta concentração de ferro, lipídios insaturados, baixos níveis de glutatona e enzimas antioxidante (BEHL, 2005; COSKUN et al. 2005; SEN e PACKER 2000). As áreas cerebrais, tais como, gânglios da base, córtex frontal e hipocampo apresentam altas concentração de ferro (JELLINGER et al. 1990; NUNEZ-MILLACURA et al. 2002), o que se torna potencialmente tóxico ao SNC em situações de estresse oxidativo (BOSTANCI et al. 2006; LIU et al. 2003). Com isso, o tratamento com fluoxetina pode aumentar a atividade serotoninérgica no SNC e a

exposição ao exercício físico exaustivo pode elevar o consumo de oxigênio, ocasionando o estresse oxidativo neste tecido.

Por outro lado, não se observou diferenças significativas nos níveis de TEAC no fígado dos animais, exceto no grupo sedentário e tratado com fluoxetina que diminuiu os níveis de TEAC. Esta situação pode estar relacionada a produção de energia e a síntese de fosfolipídios que ocorre no fígado, por meio da oxidação dos ácidos graxos (MOTTA, 200), assim como pelo aumento de antioxidantes tióis GSH ou não-tióis, que se apresentam em altas concentrações em situações normais neste órgão. A diminuição de TEAC ocasionada pela fluoxetina pode ser consequência do aumento das concentrações de Ferro neste tecido, visto que o processo de oxidação e redução que acontece no interior dos eritrócitos leva ao aumento da forma reduzida de  $Fe^{2+}$  que circula no plasma, que uma vez ligado à ceruloplasmina retorna a sua forma oxidada. Esta forma pode ser captada pela transferrina e assim transportada para o fígado, onde é armazenado e distribuído para as células, e isso pode ocasionar queda nos níveis destes antioxidantes (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007).

Além disso, do sistema antioxidante, nesse estudo também se avaliou os fatores oxidantes. O NO que é um potente vasodilatador cerebral que mantém o fluxo basal do cérebro, promovendo aumento do fluxo sanguíneo nas atividades neuronais intensas, e controlando vários de processos biológicos complexos, incluindo a homeostase da pressão sanguínea, agregação plaquetária e transmissão de sinais pelo sistema nervoso (WANG e MARDSEN, 1995; DURNER et al. 1999). Uma característica importante do NO é a sua capacidade de ser benéfica ou potencialmente tóxica dependendo da concentração ou depuração tecidual (SCMIDT e WALTER, 1994; DALLAIRE e MARETTE, 2004). Desta forma, determinadas situações, como por exemplo, a intoxicação por fármacos, como a fluoxetina associada ao exercício físico exaustivo podem acarretar aumento do estresse oxidativo com ativação de eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, provocando aumento no metabolismo celular mediado pela liberação de glicocorticoides, levando a formação de radicais de nitrogênio e oxigênio (CHEN et al. 2015).

Também foi observado que a associação da fluoxetina com o exercício físico exaustivo diminuiu os níveis de NO no sangue e no cérebro, mostrando que esta associação pode ocasionar efeitos sinérgicos na diminuição do NO em alguns órgãos. A redução nos níveis desse mediador pode estar associada ao declínio da atividade funcional da NOS (NO-sintase), enzima responsável pela catalisação do óxido nítrico no organismo, principalmente da NOS constitutiva (c-NOS). A cNOS está presente nos neurônios, nas células endoteliais vasculares e plaquetas, que produzem pequena quantidade de NO (WANG e MARDSEN, 1995; KONTUREK e KONTUREK, 1995; MONCADA, et al. 1991).

Por outro lado, os níveis de NO estavam elevados no fígado dos animais tratados com fluoxetina e exposto ao exercício físico exaustivo, o que pode ser resultado da indução da expressão e atividade da NOS induzível (i-NOS) que leva à manutenção de níveis elevados de NO nos tecidos (CLEMENT, et al. 2014). A iNOS é produzida por macrófagos, linfócitos T, células endoteliais, hepatócitos, condrócitos, neutrófilos e outras células ativadas por citocinas (STUEHR et al. 1991; GELLER et al. 1993). Além disso, a i-NOS não é expressa sob condições normais, com isso requer algumas horas para a sua expressão, mas após sintetizada, induz a produção de grandes quantidades de NO comparado a c-NOS e a produção deste mediador continua indefinidamente até a inibição da enzima ou que ocorra a morte celular (DUSTING, 1995; MONCADA et al. 1991; NATHAN e XIE, 1994).

Li et al. (2014) relataram que o exercício exaustivo de alta intensidade elevou os níveis de NO, que foi decaindo lentamente após 24 horas do exercício, corroborando com os nossos dados. Desta forma, sugere-se que a i-NOS pode ser responsável pelo aumento nos níveis de NO no fígado, produzido pelos hepatócitos em condições anormais do organismo, tais como o exercício físico exaustivo e a intoxicação por fluoxetina. Sendo assim, o exercício de alta intensidade pode resultar na infiltração de células inflamatórias e a estimulação dos neurogliócitos e macrófagos, causando um processo inflamatório e induzindo a ativação de i-NOS e a redução na atividade da c-NOS (LI et al. 2015).

Durante o exercício físico exaustivo, o aumento no consumo de oxigênio estimula a atividade dos linfócitos e das mitocôndrias em diversos órgãos, levando

ao aumento na produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (JACKSON et al. 2007; SACHDEV e DAVIES, 2007). Com isso, o aumento dos níveis de NO no fígado por ter sido provocado pelo aumento do fluxo sanguíneo muscular e do estresse causado pela vasodilatação durante o exercício, promovendo a geração contínua de NO e EROS por células endoteliais (BUSCONI e MICHEL, 1994; BALAGANUR et al. 2014).

Kim et al. (2017) relataram que durante o exercício exaustivo ocorre a indução do estresse no SNC, promovendo o excesso de síntese e metabolismo da serotonina no cérebro, levando à fadiga e a redução do desempenho do exercício humano e animal (DAVIS et al. 2000; NEWSHOLME et al. 1992; STRUDER e WEICKER, 2001). Esta situação se deve ao aumento da atividade da TPH que é a principal enzima responsável pela regulação da síntese da serotonina, aumentando assim atividade serotoninérgica (SOARES et al. 2007). No entanto, há relatos que fluoxetina e o exercício físico exercem efeitos semelhantes sobre o sistema serotoninérgico pelo aumento da disponibilidade de serotonina no SNC (LAN et al. 2014; MEEUSEN et al. 1996). Com isso, a associação do tratamento com fluoxetina e a exposição ao exercício físico moderado (esteira elétrica) melhorou a depressão de espalhamento cortical (CSD) em ratos adultos (MONTEIRO et al. 2015).

O exercício físico exaustivo pode provocar alteração no sistema imune com aumento da liberação de radicais livres e o desequilíbrio sistêmico das citocinas, especificamente as interleucinas e o fator de necrose tumoral, semelhante à resposta inflamatória (BRUUNSGAARD, 2005). O aumento do estresse pode provocar danos nas membranas das células, DNA, proteínas e até causar a morte, efeitos que podem estar relacionados com desenvolvimento de várias doenças (SINGH et al. 2011).

Delmondes et al. (2012) relatam que após a realização de exercício físico moderado e exaustivo, a produção de NO nos animais aumentou em relação ao grupo controle. Porém o grupo de exposto ao treinamento físico exaustivo apresentou maior nível de NO, que pode estar interligado ao aumento do metabolismo e do consumo de oxigênio (NUNES e FERNANDES, 2009). Achados

deste estudo que pode vim fortalecer os resultados da nossa pesquisa, visto que, os grupos expostos ao exercício físico também mostraram níveis maiores de NO.

Durante a peroxidação lipídica, vários aldeídos são liberados no interior da célula, dentre eles o MDA que é um indicador de danos à membrana plasmática e utilizado como marcador do estresse oxidativo (LIU et al. 2011; YANG et al. 2015). A peroxidação lipídica pode ser induzida pelo exercício físico ou fármacos, promovendo a inativação de enzimas de membrana celular, extravasamento de organelas e formação de produtos como o MDA. Estas modificações podem prejudicar as atividades funcionais e estruturais de proteínas sinalizadoras (SPICKETT e PITT 2012) ocasionando desordens celulares e induzindo a progressão de doenças crônicas degenerativas e morte das células (DEAN et al. 1997).

Li et al. (2015) relataram que o grupo de ratos que praticaram exercício de alta intensidade (corrida) apresentaram aumento da peroxidação lipídica, causando a elevação significativa nos níveis de MDA no sangue. Esses resultados foram similares aos nossos, visto que os animais tratados com fluoxetina e expostos ao exercício físico também elevaram os níveis de MDA no sangue e fígado, mostrando que estes estímulos quando associados potencializam o estresse oxidativo nos tecidos dos animais. Além disso, Wang et al. (2014) descreveram que o exercício exaustivo também diminuiu a capacidade dos antioxidantes em eliminar os radicais livres, levando ao aumento dos danos celulares, representado pelo aumento nos níveis de MDA.

Os níveis elevados de MDA no fígado ocasionados pela fluoxetina associada ao exercício físico exaustivo pode estar relacionado as modificações metabólicas que favorecem à elevação da produção de EROs nas células ocasionada pelo exercício físico intenso (BASU, 2004; ATALAY et al. 2006). Durante esse tipo de atividade física, as principais vias aeróbias estimulam a formação de EROS durante o metabolismo mitocondrial e o ciclo de degradação de purinas. Além disso, nessa situação ocorre a transferência dos lipoperóxidos de um tecido para outro, que são metabolizados no fígado por componentes com alta capacidade oxidativa (SUZUKI et al. 1983; JENKINS, 1993).

Além do exercício físico, a fluoxetina também pode ter induzido aumento dos níveis de MDA nesses animais, visto que este fármaco é metabolizado no fígado. Este órgão é abundante em mitocôndrias e tem sua função respiratória aumentada durante a prática de exercício exaustivo, sendo fonte, e ao mesmo tempo, estando expostos a grande quantidade de EROS e ao estresse oxidativo (CASTILHO et al. 2005). Desta forma, sugere-se que a fluoxetina e exercício causaram aumento da peroxidação lipídica nestes animais, devido ao excesso de radicais livres produzidos e diminuição de fatores antioxidantes que possam remover adequadamente o EROS. Segundo Souza et al. (1994), a fluoxetina afeta diretamente a estrutura da membrana mitocondrial de hepatócitos, gerando um aumento de peroxidação de lipídios e a diminuição das enzimas antioxidantes. Monteiro et al. (2015) mostraram que a combinação de fluoxetina e exercício físico (esteira elétrica) em ratos wistar foi capaz de reduzir a depressão no espalhamento cortical, mostrando efeito benéfico dessa combinação no cérebro.

Os níveis diminuídos de MDA no cérebro dos animais tratado com fluoxetina podem estar associados a um efeito estimulador do fármaco sobre fatores antioxidantes, como GSH que pode reduzir os níveis de MDA neste tecido. Além disso, estudos comprovam o aumento da peroxidação lipídica causada pelo exercício físico exaustivo (BASU, 2004; ATALAY et al. 2006). Entretanto, o tratamento com fluoxetina pode em algumas situações promover o aumento do estresse oxidativo (INKIELEWICZ-STEPNIAK, 2011) e em outras apresenta efeito antioxidante, como observado em nosso estudo (SOUZA et al. 1994). Tal fato, deve-se ao cérebro desenvolver um processo de adaptação em casos de aumento da produção de ROS, ocasionada por suas características fisiológicas e anatômicas específicas (BRAGA, 2008).

No SNC, a oxidação de lipídios ocorre de forma diferenciada em diversas regiões cerebrais, devido ao consumo de oxigênio e o metabolismo de proteínas e células serem diferentes as diferentes áreas do cérebro (FLOYD e CARNEY, 1991; ZHANG et al. 1993). Após treinamento de natação, ratos jovens e velhos apresentaram melhoras no aprendizado e na memória (RADÁK et al. 2001), além de diminuir a lipoperoxidação em cerebelo, hipocampo e córtex cerebral (RADÁK et al.

2006; JOLITHA et al. 2006). Moretti et al. (2012) por sua vez, relataram que o a utilização da fluoxetina apresentou efeito preventivo contra o estresse induzido, sugerindo uma redução da peroxidação lipídica no hipocampo. Segundo Réus et al. (2012), os efeitos da fluoxetina são dependentes da dose e da área do cérebro. Esses dados corroboram ao nosso estudo que mostraram que a fluoxetina no cérebro levou a diminuição do MDA, entretanto aumentou os níveis deste parâmetro no sangue e fígado.

## 7. CONCLUSÃO

Baseado nos resultados obtidos neste trabalho, concluiu-se que:

- O tratamento com a fluoxetina associada à prática de exercício físico exaustivo induziu uma redução na locomoção ou aumento da imobilidade no parâmetro número de entradas no campo aberto, e uma diminuição no comportamento semelhante a ansiedade.
- Quanto aos parâmetros oxidativos, a fluoxetina associada à prática de exercício físico exaustivo, de maneira geral, induziu estresse oxidativo no organismo, principalmente no sangue e fígado destes animais, com redução dos níveis de GSH e TEAC e aumento dos níveis de NO e MDA. Por outro lado, no cérebro, o tratamento com fluoxetina mostrou efeito protetor sobre o estresse oxidativo, com redução nos níveis de NO e MDA e aumento em fatores antioxidantes.

Diante destes achados, sugere-se que os mecanismos envolvidos na produção da ansiedade são complexos e não são totalmente compreendidos. Além disso, as interações entre estresse oxidativo e estresse emocional podem estar envolvidos nas mudanças no comportamento de ansiedade. Com isso, sugere-se que a modulação dos níveis de serotonina pela fluoxetina tenha efeito dual sobre os parâmetros oxidativos, visto que, dependendo do local de ação este fármaco apresentou efeito antioxidante ou pró-oxidante. Tais resultados sugerem que a utilização da fluoxetina associada ao exercício físico pode contribuir para a melhora de alguns dos efeitos ansiolíticos, por meio de alterações na função neural com reduções no estresse oxidativo no SNC. No entanto, também se conclui que fluoxetina associada ao exercício físico exaustivo tem efeito ansiolítico e dual nos parâmetros oxidativos, dependendo do tecido investigado. Desta forma, ainda há necessidades de estudos mais aprofundados que esclareçam melhor os possíveis mecanismos de ação e expliquem este efeito dual pró-oxidante e antioxidante, visto que há escassez de publicações abordando o uso da fluoxetina em praticantes de exercício físico exaustivo.



## 8. PRINCIPAIS REFERÊNCIAS

- AEBI, H. Catalase in vitro. In: Packer L. *Methods in Enzymology*, Vol. 105. Academic Press, Orlando, p. 121–126, 1984.
- ABDEL-SALAM, O.M.E.; BAIUMOY, A.R.; ARBID, M. Studies on the anti-inflammatory effect of fluoxetine in the rat. *Pharmacol Res* 49: 119–131, 2004.
- ABDEL-SALAM, O.M.E. The effect of antidepressant drugs on thioacetamide-induced oxidative stress. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences.*; 17: 735-744. 2013.
- ADELL, A.; CELADA, P. et al. Origin and functional role of the extracellular serotonin in the midbrain raphe nuclei." *Brain Res Brain. Rev* 39(2-3): 154-180, 2002.
- ANDERSON, M.E. Glutathione: an overview of biosynthesis and modulation. *Chemico- Biological Interactins*, 111-112:1. 1998.
- AFONSO, A.; REINAS, C. et al. Ansiedade (Serotonina e GABA). A loucura e o controle das emoções. *Rev. Psicofisiologia, Minas Gerais*, v. 1, n. 1 e 2, cap. 5, 1997.
- AHMAD, A.; RASHEED, N. et al. Alterations in monoamine levels and oxidative systems in frontal cortex, striatum, and hippocampus of the rat brain during chronic unpredictable stress. *Stress* 13(4): 355-364, 2010.
- AKIMOVA, E.; LANZENBERGER, R. KASPER, S. The serotonin-1A receptor in anxiety disorders. *Biol Psychiatry.*;66:627–635. 2009.
- ALESSIO, H. M. et al. Consumption of green tea protects rats from exercise-induced oxidative stress in kidney and liver. *Nutr. Res.*, v. 22, p. 1177-1188, 2002.
- ALEXI, T. et al. 3-Nitropropionic, 92, acid's lethal triplet: cooperative pathway of neurodegeneration. *Neuro Report*, 9: R57-R64, 1998.
- ALTAMURA, A.C. et al. Clinical pharmacokinetics of fluoxetine. *Clin. Pharmacokinet*, 1994.
- AMÂNCIO, S.A. et al. Fluoxetine inhibits cortical spreading depression in weaned and adult rats suckled under favorable and unfavorable lactation conditions. *Experimental Neurology*. v. 200, p.275-282, 2006.
- ANDRADE, A.; PINTO, S.C.; OLIVEIRA, R.S. *Animais de Laboratório: criação e experimentação*. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 388 p. ISBN: 85-7541-015-6, 2002.
- ANDRADE, LHS; GORENSTEIN, C. Aspectos gerais das escalas de avaliação de ansiedade. *Rev Psiq Clin* 25 (6):285-290, 1998.

- ANDREWS, N. et al. 5-HT<sub>1A</sub> receptors in the median raphe nucleus and dorsal hippocampus may mediate anxiolytic and anxiogenic behaviors respectively. *Eur. J. Pharmacol*, 264: 259-64, 1994.
- ANDREW, P.J.; MAYER, B. Enzymatic function of nitric oxide synthases. *Cardiovascular research*, v. 43, n. 3, p. 521–31, 1999.
- ARANGO, V.; HUANG, Y. et al. Genetics of the serotonergic system in suicidal behavior. *J. Psychiatr Res* 37(5): 375-386, 2003.
- ARCHER, J. Tests for emotionality in rats and mice. A review *Behaviour*, v.21, p. 205-35, 1973.
- ARMSTRONG, R.B. Eccentric exercise-induced injury to rat skeletal muscle. *J Appl Physiol.*;54(1):80–93. 1983.
- ASHBY, C.R.; EDWARDS. E.; WANG, R.Y. Evidência eletrofisiológica de uma interação funcional entre 5-HT (1A) e de 5-HT (2A) receptores no córtex pré-frontal de rato medial: um estudo iontoforético. *Synapse*. 1994.
- ASTRAND, P.; RODAHL, K. Tratado de fisiologia do exercício. 2. ed. Rio de Janeiro: Interamericana, p. 617.1977.
- ASTRAND, P.O.; RODAHL, K. Textbook of work physiology. New York: McGraw Hill, 1986.
- ATAK, J. R. Anxiolytic compounds acting at the GABA<sub>A</sub> receptor benzodiazepine binding site. *Curr. Drug Targets. CNS Neurol. Disord.* 2: 213-232, 2003.
- ATALAY, M. et al. Dietary antioxidants for the athlete. *Curr Sports Med Rep*;5(4):182-6.2006.
- AZBILL, R. D.; MU, X. J.; BRUCEKELLER, A. J. et al. Impaired mitochondrial function, oxidative stress and altered antioxidant enzyme activities following traumatic spinal cord injury. *Brain Res.*, 765:283-290, 1997.
- AZMITIA, E.C. SEGAL, M. Na autoradiographic analysis of the differential ascending projections of the dorsal and median raphe nuclei in the rat. *J. Comp. Neurology*, 179, 641-688, 1978.
- BAHI, A. Increased anxiety, voluntary alcohol consumption and ethanol-induced place preference in mice following chronic psychosocial stress. *Stress (Amsterdam, Netherlands)*, v. 16, n. 4, p. 441–51, 2013.
- BAILEY, S.P.; DAVIS, J.M.; AHLBORN, E.N. Effect of increased brain serotonergic (5-HT<sub>1c</sub>) activity on endurance performance in the rat. *Acta Physiologica Scandinavica*, San Francisco, v.145, p.76-77, 1992.
- BALAGANUR V. Effect of S-methylisothiourea, an inducible nitric oxide synthase inhibitor, in joint pain and pathology in surgically induced model of osteoarthritis. *Connect. Tissue Res*: 55: 367-377.2014.

- BALLATORI, N. et al. Glutathione dysregulation and the etiology and progression of human diseases. *The journal of Biological Chemistry*. 390, pp. 191-214. 2009.
- BALDESSARINI, R.J.; MARSH, E.R.; KULA, N.S. Interações da fluoxetina com o metabolismo da dopamina e serotonina em regiões do cérebro de ratos. *Brain Res*. 579 : 152-156, 1992.
- BANNERMAN, et al. Regional dissociations within the hippocampus-memory and anxiety. *Neuroscience and Behavioral Reviews*. 28, 273-283, 2004.
- BARBISAN, L.F.; MIYAMOTO, M. et al. Influence of aqueous extract of *Agaricus blazei* on a rat liver toxicity induced by different doses of diethylnitrosamine. *J Ethnopharmacol*, 83:25–32, 2002.
- BARREIROS, A.L.; DAVID, J.M. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Quim. Nova*, V.29, p.113-123, 2006.
- BASU, S. Isoprostanes: novel bioactive products of lipid peroxidation. *Free Radic Res*. 38(2):105-22.2004.
- BATLOUNI, M. Hipotese oxidativa da Aterosclerose e emprego dos Antioxidantes na doença arterial coronária. *Artigos Brasileiros de cardiologia*, v. 68, n. 1, p. 55-63, 1997.
- BAYNARD, T. et al. Exercise training effects on inflammatory gene expression in white adipose tissue of young mice. *Mediators Inflamm*. 2012:767953. 2012.
- BEAR, M.F.; CONNORS, B.W.; PARADISO, M.A. Transtornos mentais. *Neurociências – Desvendando o sistema nervoso*. Porto Alegre: Artmed, 2 ed, cap 21, p. 675-701, 2006.
- BECKMAN, D.; SANTOS, L. E. The Importance of Serotonin in Exercise-Induced Adult Neurogenesis: New Evidence from  $Tph_2$ / Mice. *The Journal of Neuroscience*, v. 33, n. 36, p. 14283–14284, 2013.
- BEHR, G. A.; MOREIRA, J. C. F.; FREY, B. N. Preclinical and Clinical Evidence of Antioxidant Effects of Antidepressant Agents: Implications for the Pathophysiology of Major Depressive Disorder. *Oxid. Med. Cell. Longev*. Article ID 609421:13, 2012.
- BEHL, C. Oxidative stress in Alzheimer's disease: implications for prevention and therapy. *Subcell Biochem*. 38, 65-78. 2005.
- BELZUNG, C.; LE PAPE, G. Comparison of different behavioral test situations used in psychopharmacology for measurement of anxiety. *Physiol Behav* 56:623-628, 1994.
- BELZUNG, C.; TURIAULT, M.; GRIEBEL, G. Optogenetics to study the circuits of fear- and depression-like behaviors: a critical analysis. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*, v. 122, p. 144–57, 2014.
- BENZI, G. Aerobic performance and oxygen free radicals. *J Sports Med Phys Fitness*; 33:205-22, 1993.

BERK, M. Oxidative biology: new intervention opportunities in psychiatry. *Acta Neuropsychiatr.*, 19:259–60, 2007.

BERNARD, L.P.; RAZMPOUR, R.; ZEEVALK, D. Glutathione and Parkinson's disease: Is this the elephant in the room? *Biomedicine & Pharmacotherapy*.62(4),p.236-249.2008.

BIANCHI, M.L.P.; ANTUNES, L.M.O. Free radicals and the main dietary antioxidants. *Rev Nutrição*. 12(2):123-130, 1999.

BLANCHARD, R.J.; BLANCHARD, D.C. Defensive reactions and exploratory behavior in rats. *J Comp Physiol Psychol.*; 87:1129-33, 1974.

BOSTANCI, M.O.; BAGIRICI, F; CANAN, S. A calcium channel blocker flunarizine attenuates the neurotoxic effects of iron. *Cell. Biol. Toxicol.* 2: 119-25- 2006.

BORAN, P.; TOKUC, G.; YEGIN, Z. Methemoglobinemia due to application of prilocaine during circumcision and the effect of ascorbic acid. *J. Pediatr. Urol.*, v.4, p. 475–476, 2008.

BOURNE, L.C.; RICE-EVANS, C.A. Detecting and measuring bioavailability of phenolics and flavonoids in humans: pharmacokinetics of urinary excretion of dietary ferulic acid. IN: *Methods in Enzymology*, New York, v. 299, p. 91-151, 1999.

BOURIN, M. et al. Animal models of anxiety in mice. *Fundam Clin Pharmacol.* 21(6): 567-574, 2007.

BRAGA, A. R. Indução da morte de neurônios dopaminérgicos por mptp como modelo animal da doença de parkinson: uma abordagem molecular e farmacológica. Tese (Doutorado em Ciências Farmacologia). Pós-Graduação em Farmacologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2008.

BRUNTON, L.L.; CHABNER, B.A; KNOLLMANN, B.C. *As Bases Farmacológicas da Terapêutica de Goodman e Gilman*. 12. ed. Porto Alegre: AMGH, 2012.

BUKOWSKA, B.; KOWALSKA, S. Phenol and catechol induce prehemolytic and hemolytic changes in human erythrocytes. *Toxicology Letters.*, v.152, p.73–84, 2004.

BURHANS, W.C.; HEINTZ, N.H. The cell cycle is a redox cycle: linking phase-specific targets to cell fate. *Free Radic Biol Med*; 47:1282–1293, 2009.

BURSCH, W.; OBERHAMMER, F. SCHULTE-HERMANN, R. Cell death by apoptosis and its protective role against disease. *Trends Pharmacol Sci*; p.245–251, 1992.

BUSCONI, L.; MICHEL, T. Endothelial nitric oxidesynthase membrane targeting. Evidence against involvement of a specific myristate receptor. *The Journal of biological chemistry*, Bethesda, v. 269, no.40, p. 25016-25020, 1994.

BRUUNSGAARD, H. Physical activity and modulation of systemic low-level inflammation. *Journal Leukocyte Biology*, Winston-Salem, v.78, p. 819–835, 2005.

- CACCIA, S. et al. Efeitos da administração a curto e longo prazo da fluoxetina sobre o teor de monoamina do cérebro de rato. *Neurofarmacologia*. 31 : 343-347, 1992.
- CAMPANELLA, M.E.; CHU, H. LOW, P.S. Assembly and regulation of a glycolytic enzyme complex on the human erythrocyte membrane. *P Natl Acad Sci USA*. 102:2402-2407.2005.
- CAROBREZ, A. P.; BERTOGLIO, L. J. Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: the elevated plus-maze model 20 years on. *Neurosci Biobehav Rev*, v.29, n.8, p.1193-1205. 2005.
- CARLEY, D. W.; RADULOVACKI, M. Mirtazapine, a mixed-profile serotonin agonist/antagonist, suppresses sleep apnea in the rat." *Am J Respir Crit Care Med* 160(6): 1824-1829, 1999.
- CARLINI, A.; NOTO, R.; NAPPO, A; SANCHEZ, M. et al. Fluoxetina: indícios de uso inadequado. *Jornal Brasileiro de Psiquiatria. J. bras. psiquiatr.* vol.58 no.2 Rio de Janeiro 2009.
- CASPERSEN, C. J.; POWELL, K. E. et al. Physical activity, exercise, and physical fitness: definitions and distinctions for health-related research. *Public Health Reports*, 100:126–131, 1985.
- CASTILHO, C. Effect of S-adenosylmethionine on age-induced hepatocyte damage in old wistar rats. *Biogerontology*, 6(5), 313-323. 2005.
- CHAMPE, P. C.; HARVEY, R. A.; FERRIER, D. R. *Bioquímica ilustrada*. 3.ed. Porto Alegre: Artmed Editora, 2006.
- CHEN, H.J.C. et al. Response of the nitrenergic system to activation of the neuroendocrine stress axis. *Frontiers in neuroscience*, v. 9, p. 3, 2015.
- CIANA, A.; MINETTI, G.; BALDUINI, C. Phosphotyrosine phosphatases acting on band 3 in human erythrocytes of different age: Ptp1b processing during cell ageing. *Bioelectrochemistry* ;62:169-173.2004.
- CIRANNA, L.; CATANIA, M. V. 5-HT7 receptors as modulators of neuronal excitability, synaptic transmission and plasticity: physiological role and possible implications in autism spectrum disorders. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, v.27, n. 8, p. 1- 17, 2014.
- CLÉMENT, J. et al. Influence of biomechanical multi-joint models used in global optimisation to estimate healthy and osteoarthritis knee kinematics. *Comput. Methods Biomech. Biomed. Engin.* 17: 76-77.2014.
- COLEMAN, M. D.; TINGLE, M. D. Use of a metabolic inhibitor to reduce dapsone-dependent haematological toxicity. *Drug Dev. Res.*, v. 25, p.1-16, 1992.
- COLLINS, A.R.; AI-GUO, M.; DUTHIE, S.J. The kinetics of repair of oxidative DNA damage (strand breaks and oxidised pyrimidines) in human cells. *Mutation Research*, v.336, p. 69 – 77, 1995.

- COSKUN, S. The effects of vitamin C supplementation on oxidative stress and antioxidant content in the brains of chronically exercised rats. *Mol. Cell Biochem.* 1-2, 135-8. 2005.
- COTE, F.; FLIGNY C. et al. "Maternal serotonin is crucial for murine embryonic development." *Proc Natl Acad Sci USA* 104(1): 329-334, 2007.
- CRESCENZO, F. et al. Selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs) for postpartum depression (PPD): A systematic review of randomized clinical trials. *Journal of Affective Disorders*, v. 152-154, p. 39-44, 2014.
- CRUZ, A.P.M; FREI, F.; GRAEFF, F.G. Ethopharmacological analysis of rat behavior on the elevated plus-maze. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 49, 171-176. 1994.
- CRYAN, J.F.; HOLMES, A. The ascent of mouse: advances in modeling human depression and anxiety. *Nature Reviews Drug Discovery*. v.4(9), p. 775-790, 2005.
- DAHLSTROEM, A.; FUXE, K. Evidence for the existence of monoamine-containing neurons in the central nervous system. I. Demonstration of monoamines in the cell bodies of brain stem neurons. *Acta Physiol Scand Suppl.*: SUPPL 232:1-55, 1964.
- DANDIYA, P.C. et al. Effects of LSD on open field performance in rats. *Psychopharmacologia*, v. 15, p. 333-340, 1969.
- DAVID, D.J. et al. Neurogenesis-dependent and-independent effects of fluoxetine in an animal model of anxiety/depression. *Neuron.*; 62(4): 479-493, 2009.
- DAVID, L.A.; CHRISTY, J.P.; MARY E.C. Differential *Rearing* Alters Forced Swim Test Behavior, Fluoxetine Efficacy, and Post-Test Weight Gain in Male Rats. *PLoS One*. 10(7), 2015.
- DAVIS, J.M. Serotonin and central nervous system fatigue: nutritional considerations. *Am J Clin Nutr.*; 72:573S-578S. 2000.
- DEAKIN, J.F.W.; GRAEFF, F.G. 5-HT and mechanisms of defense. *Journal of Psychopharmacology*, 5(4): 305-315, 1991.
- DEAN, R.T. Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *Biochem J.*;324:1-18. 1997.
- DELMONDE DALLAIRE, P.; MARETTE, A. Obesity-linked insulin resistance: is nitric oxide the missing link?. *Canadian Journal of Diabetes*, Philadelphia, v. 28, no. 1, p. 59-66, 2004.
- DELMONDES, G.M.B. et al. Efeito do treinamento físico moderado e intenso sobre os mecanismos de defesa de ratos adultos. *Motriz: rev. educ. fis.* vol.18 no.4 Rio Claro Oct./Dec. 2012.

- DEKHUIJZEN, P.N.R. Antioxidant properties of N-acetylcysteine: their relevance in relation to chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J.*, 23: 629–636, 2004.
- DENEKE, S.M.; FANBURG, B.L. Regulation of cellular glutathione. *Am. J. Physiol.*, v. 257, n. 4 (Pt 1), p. L163-173, 1989.
- DICKINSON, A. D.; FORMAN, J.H. Glutathione in defense and signaling lessons from a small tiol. *J. Ann. N. Y. Acad. Sci.* 973, 488-504. 2000.
- DILLARD, C. J. et al. Effects of exercise, vitamin E, and ozone on pulmonary function and lipid peroxidation. *J. Appl. Physiol.*, v. 45, n. 6, p. 927-932, 1978.
- DJORDJEVIC, J.; DJORDJEVIC, A. et al. Fluoxetine affects antioxidante system and promotes apoptotic sinaling in Wistar rat liver. *Eur J Pharmacol.* 2011.
- DRAPIER, D. Efeitos da fluoxetina aguda, paroxetina e desipramina em ratos testados no labirinto positivo elevado. *Behav Brain Res.* 176 : 202-209, 2007.
- DRINGEN, R. Metabolism and functions of gutathione in brain. *Progress in Neurobiology*, 62. P. 649-669. 2000.
- DULAWA, S.C. Dopamine D4 receptor-knock-out mice exhibit reduced exploration of novel stimuli. *J Neurosci* 19:9550-9556, 1999.
- DULAWA, S.C. et al. Effects of chronic fluoxetine in animal models of anxiety and depression. *Neuropsychopharmacology*, advance online publication, 1321–1330, 2004.
- DURNER, J. Ancient origins of nitric oxide signaling in biological systems. *PNAS*, v.96, n.14, p.206- 207, 1999.
- DUSTING, G.J.; MACDONALD, P.S. Endogenous nitric oxide incardiovascular disease and transplantation. *Ann. Med.*, 27:395-406, 1995.
- DURKIN, S.; PRENDERGAST, A.; HARKIN, A. Redução da eficácia da fluoxetina após a perda de serotonina induzida por MDMA ("ecstasy") em ratos. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psiquiatria.* 32 : 1894-1901, 2008.
- EMSLIE, G.; JUDGE, R. Tricyclic antidepressants and selective serotonin reuptake inhibitors: use during pregnancy, in children/adolescents and in the elderly. *Acta Psychiatr Scand Suppl* 403:26Y34, 2000.
- ELLMAN, G. L. Tissue sulfhydryl groups. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 82, n. 1, p. 70-7, May 1959.
- EREN, I.; NAZIROGLU, M.; DEMIRDAS, A. Protective effects of lamotrigine, aripiprazole and escitalopram on depression-induced oxidative stress in rat brain. *Neurochem. Res.*, 32:1188–95, 2007.
- ERSPAMER, V. Historical introduction: the Italian contribution to the discovery of 5-hydroxytryptamine (enteramine, serotonin). *J Hypertens Suppl* 4(1): S3-5, 1986.

- ETKIN, A. Neurobiology of anxiety: from neural circuits to novel solutions? *Depression and anxiety*, v. 29, n. 5, p. 355–8, 2012.
- FARMACOPEIA BRASILEIRA. 5. ed. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2010.
- FERNANDES, V.E. et al. Efeitos Comportamentais e Imunológicos da Fluoxetina em Ratos Submetidos ao Nado Forçado. *Psic.: Teor. e Pesq.* Vol. 28 n. 4, pp. 409-415, Brasília. 2012.
- FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Rev. Assistencia Medica Brasil*. 43(1):61- 68. 1997.
- FERREIRA, A.F.B. et al. Short-term, moderate exercise is capable of inducing structural, BDNF-independent hippocampal plasticity. *Brain Research*, v. 1425, p. 111 – 122, 2011.
- FILE, S.E. et al. Modification of chlordiazepoxide's neurochemical effects by handling and plus-maze experience. 1992.
- FILE, S.E.; GONZALEZ, L.E. Anxiolytic effects in the plus-maze of 5-HT<sub>1A</sub> receptor ligands in dorsal raphe and ventral hippocampus. *Pharmacology, Biochemistry & Behavior* 54, 123-128. 1996.
- FINSTERER, J. Biomarcadores de fadiga dos músculos periféricos durante o exercício. *BMC Musculoskelet. Disorder*. 13 : 218. 2012.
- FIRENZUOLI, F.; GORI, L.; LOMBARDO, G. The Medicinal Mushroom *Agaricus blazei* Murrill: Review of Literature and Pharmaco-Toxicological Problems. *e CAM*, 5(1): 3–15, 2008.
- FLOYD, K.A.; CARNEY, J.M. Age influence on oxidative events during brain ischemia/reperfusion. *Arch Gerontol Geriatr*. 12: 155-177. 1991.
- FRANKFURT, M.; MCKITTRICK, C.R.; LUINE, V.N. O tratamento a curto prazo com fluoxetina altera os níveis de monamina e o turnover em núcleos discretos de cérebro. *Brain Res*. 1994; 650 : 127-132, 1994.
- FULLER, R. W.; WONG, D. T. Serotonin reuptake blockers in vitro and in vivo. *J Clin Psychopharmacol* 7: 14–20, 1987.
- GAETANI, G. D. et al. Intracellular restraint: a new basis for the limitation in response to oxidative stress in human erythrocytes containing low-activity variants of glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 71, n. 9, p. 3584-3587, 1974.
- GALLEANO, M. PUNTARULO, S. Role of antioxidants on the erythrocyte resistance to lipid peroxidation after acute iron overload in rats. *Biochem. Biophys. Acta*, v. 1271, n. 2-3, p. 321-326, 1995.



- GAO, Y. Treadmill exercise promotes angiogenesis in the ischemic penumbra of rat brains through caveolin-1/VEGF signaling pathways. *Brain Res.* 1585:83-90, 2014.
- GELLER, D.A. Molecular cloning and expression of inducible nitric oxide synthase from human hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* , 90: 3491-3495. 1993.
- GHISELLI, A. Total antioxidant capacity as a tool to assess redox status: critical view and experimental data. *Free Radical Biology e Medicine*, v29, n1106-1114.2000.
- GIANNI, P. et al. Glutathionyl specificity of thioltransferases: mechanistic and physiological implications. In: *Biothiols in Health and Disease*, 1995.
- GIBSON, C A; NOAKES, T.D. Evidence for complex system integration and dynamic neural regulation of skeletal muscle recruitment during exercise in humans. *Br J Sports Med.*; 38:797-806. 2004.
- GOMOLL, B. P.; KUMAR, A. Managing anxiety associated with neurodegenerative disorders. *F1000prime reports*, v. 7, p. 05, 2015
- GONZALEZ, L.E.; ANDREWS, N.; FILE, S.E. 5-HT<sub>1A</sub> and benzodiazepine receptors in the basolateral modulate anxiety in the social interaction test, but not in the elevated plus-maze test. *Brain Research*, 732: 145-153, 1996.
- GOODNICK, P.J.; GOLDSTEIN, B.J. Selective serotonin reuptake inhibitors in affective disorders – I: Basic pharmacology. *J Psychopharmacol*, 12 (3 suppl B): S3-S20, 1998.
- GORENSTEIN, C.; POMPEIA, S. Farmacocinética e farmacodinâmica dos benzodiazepínicos. In: BERNIK, M. A. (ed). *Benzodiazepínicos: quatro décadas de experiência*. São Paulo: EDUSP, 29-43, 1999
- GRAEFF, F.G.; SILVEIRA, M.C.L. et al. Role of the amygdala and periaqueductal gray in anxiety and panic. *Behavioral Brain Research*, 58: 123-131, 1993.
- GRAEFF, F.G. Role of 5-HT in defensive behaviour and anxiety. *Journal of Neuroscience*, 4: 181-211, 1994.
- GRAEFF, F.G.; GUIMARÃES, F. S. et al. Role of 5-HT in stress, anxiety, and depression. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 54(1), 129-141. 1996.
- GRAEFF, F.G. Serotonergic systems. *Psychiatric Clinics North America*, v. 20, n. 4, p. 723-39, 1997.
- GRAEFF, F.G.; GUIMARÃES, F.S. *Fundamentos de Psicofarmacologia*. São Paulo: Atheneu, 240p. 2000.
- GRAEFF, F.G. Aspectos neuroquímicos: o papel da serotonina no transtorno obsessivo-compulsivo. *Rev Bras Psiquiatr* 23 (supl. 2): 35-37, 2001.
- GRAEFF, F.G. Bases Biológicas da ansiedade. In: Kapczinski F, Quevedo J, Izquierdo I et al. *Bases Biológicas dos transtornos psiquiátricos*. 2º. Edição. Porto Alegre: Artmed; 2004.

GRAEFF, F.G.; ZANGROSSI, H. The dual role of serotonin in defense and the mode of action of antidepressants on generalized anxiety and panic disorders. *Central Nervous System Agents in Medicinal Chemistry* 10, 207–17. 2010.

GRANGER, D. L.; HIBBS, J. B. et al. Metabolic fate of Larginine in relation to microbiostatic capability of murine macrophages. *J Clin Invest.* v. 85, n. 1, p. 264-273, 1999.

GRASSO, S.; SCIFO, C.; CARDILE, V.; GULINO, R. e RENIS, M. Adaptative responses to the stress induced by hyperthermia or hydrogen peroxide in human fibroblasts. *Experimental Biology and Medicine.*, v. 228, p.491–498, 2003.

GREEN, A.R. The cerebral regulation of 5-hydroxytryptamine synthesis and metabolism in relation to functional physiological effects. In: BOULLIN, D.J. *Serotonine in mental abnormalities*, Editora John Wiley e Sons, p. 71-94, 1978.

GREEN, L. C. et al. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. *Analytical biochemistry*, v. 126, p. 131–138, 1982.

GREENWOOD, B.N. Freewheel running prevents learned helplessness/behavioral depression: role of dorsal raphe serotonergic neurons. *J Neurosci.* 23;2889-2898.2003.

GREENWOOD, B.N.; FLESHNER, M. Exercise, stress resistance, and central serotonergic systems. *Exercise Sport Science Review*, v. 39, n. 3, p.140-9, 2011.

GUIMARÃES, C. et al. Tolerability and effectiveness of fluoxetine, metformin and sibutramine in reducing anthropometric and metabolic parameters in obese patients. *Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabolismo*, v. 50, n. 6, p.1020-1025, 2006.

HALFORD, J.C.; BLUNDELL, J.E. "The 5-HT<sub>1B</sub> receptor agonist CP-94,253 reduces food intake and preserves the behavioural satiety sequence." *Physiol Behav* 60(3): 933-939, 1996.

HALFORD, J.C. et al. Serotonin (5-HT) drugs: effects on appetite expression and use for the treatment of obesity. *Current Drug Targets*, Notre Dame, v.6, n.2, p.201-13, 2005.

HALL, C.S. Emotional behavior in the rat. Defecation and urination as measures of individual differences in the emotionality. *J Comp Psychol*, v.18, n.3, p.385-403. 1934.

HALLIWELL, B. GUTTERIDGE, JM. *Free Radic Biol Méd.* 3<sup>a</sup> ed. Clarendon, Oxford, pp. 105-150, 1984.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. *Free radicals in biology and medicine.* 2nd ed. Oxford: Clarendon, 1989.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol*; 186: 1-85, 1990.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Free Radical in Biology and Medicine, 3rd ed. Oxford University Press: Oxford, 2002; 4th ed. 2007.

HALLIWELL, B. Reactive oxygen species and the central nervous system. *J Neurochemical*; 59: 1.609-23, 1992.

HALLIWELL, B.; CHIRICO, S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *American Journal Clinical*, v. 57, suppl., 5, p. 715S-724S, 1993.

HALLIWELL, B. Free radicals, antioxidants and human disease: curiosity, cause or consequence? *Lancet.*, 344:721-724, 1994.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.MC. Free radicals and antioxidants in the year 2000: a historical look to the future. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 899(1), 136-147, 2000.

HALLIWELL, B. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now. *J. Neurochem.* 97:1634-1658, 2006.

HAMON, M.; BOURGOIN, S. Pharmacological profile of antidepressants: a likely basis for their efficacy and side effects. *Eur Neuropsychopharmacol*; 16:S625-S632. 2006.

HANDLEY, S. L.; MITHANI, S. Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of "fear"-motivated behaviour. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, v. 327, n. 1, p. 1-5, 1984.

HANDLEY, A. et al. Movement disorders after stroke. *Age and ageing*, v. 38, n. 3, p. 260-6, 2009.

HARRISON, M. L. et al. Role of band 3 tyrosine phosphorylation in the regulation of erythrocyte glycolysis. *J Biol Chem*; 266:4106-4111. 1991.

HARKIN, A. et al. A metilendioxianfetamina produz a perda terminal do nervo da serotonina e diminui as respostas comportamentais e neuroquímicas ao antidepressivo fluoxetina. *Eur J Neurosci.* 18 : 1021-1027, 2003.

HARRIS-WARRICK, R.M; COHEN, A.H. Serotonin modulates the central pattern generator for locomotion in the isolated lamprey spinal cord. *J. Exp. Biol.* 116: 27-46, 1985.

HEBBEL, R.P. Erythrocyte antioxidants and membrane vulnerability. *J. Lab. Clin. Med.*, v. 107 (5), p. 401 - 404, 1986.

HEISLER, L.K. COWLEY, M.A, et al. Activation of Central Melanocortin Pathways by Fenfluramine. *Science.* 297:609-611, 2002.

HIEMKE, C.; HARTTER, S. Pharmacokinetics of selective serotonin reuptake inhibitors. *Pharmacol Ther* 85(1): 11-28, 2000.

HIRATA, L.L. SATO, M.E.O. SANTOS, C.A.M. Cutaneous aging and free radicals. *Acta Farmaceutica Bonaerense.* 23(3):418-424, 2004.

HOMBERG, J.R. et al. Fluoxetine Exerts Age-Dependent Effects on Behavior and Amygdala Neuroplasticity in the Rat. *PlosOne.*; 6(1), 2011.

HOYER, D. et al. Serotonin receptors in human brain. I: characterization and autoradiographic localization of 5-HT<sub>1A</sub> recognition sites. Apparent absence of 5-HT<sub>1B</sub> recognition sites. *Brain research*, 376, 85-96. (1986).

HOYER, D.; CLARKED, D.E et al. International Union of Pharmacology classification of receptors for 5-hydroxytryptamine(Serotonin). *Pharmacol Rev.* 46(2): 157-203, 1994.

HOYER, D.; MARTIN, G. 5-HT receptor classification and nomenclature towards a harmonization with the human genome. *Neuropharmacology*, 36 (4-5): 419-428. (1997).

HOYER, D.; HANNON, J.P. et al. Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors. *Pharmacol. Biochem Behav.* 71(4): 533-554, 2002.

HJORTH, S. Hypothermia in the heat induced by the potent serotonergic agent 8-OH-DPAT. *Journal of Neural Transmission*, New York, v.61, n.1-2, p.671-7, 1985.

HUGHES, R. N. Chlordiazepoxide-modified exploration in rats. *Psychopharmacology*, (Berlin), v. 24, p462-469, 1972.

INKIELEWICZ-STEPNIAK, I. Impact of fluoxetine on liver damage in rats. *Pharmacol Rep.* 63(2), p. 441-447, 2012.

JACKSON, MJ. Radicais livres na pele e nos músculos: agentes prejudiciais ou sinais para adaptação? *Proc Nutr Soc.* 58 (3): 673-676. 1999.

JACKSON, M.J. et al. Free radical biology in skeletal muscle the production of reactive oxygen and nitrogen species by skeletal muscle. *J Appl Physiol.*;102:1664–1670. 2007.

JACOBSEN, J.P.R.; MEDVEDEV, I.O.; CARON, M.G. The 5-HT deficiency theory of depression: perspectives from a naturalistic 5-HT deficiency model, the tryptophan hydroxylase 2Arg439His knockin mouse. *Philosophical Transactions of Royal Society Biological Sciences*, v. 367, p. 2444–2459, 2012.

JACOTTE-SIMANCAS, A. et al. Effects of voluntary physical exercise, citicoline, and combined treatment on object recognition memory, neurogenesis, and neuroprotection after traumatic brain injury in rats. *Journal of Neurotrauma*, v. 32, n. 10, p. 739-51, 2015.

JAMES, P.k.; LARS-OLIVER, K. Free radicals and related reactive species as mediators of tissue injury and disease: implications for Health, *Critical Reviews in Toxicology*, 45:9, 765-798, 2015.

JELLINGER, K. Brain iron and ferritin in Parkinson's and Alzheimer's diseases. *J Neural Transm. Park. Dis. Dement Sect.* 4:327-40. 1990.

- JENKINS, R.R.; GOLDFARB, A. Introduction: oxidant stress, aging and exercise. *Medicine & Science in Sports & Exercise*, Madison, v.25, p.210-12, 1993.
- JENKINS, R.R. Exercise, oxidative stress, and antioxidants: a review. *Int J Sport Nutr.*;3(4):356-75.1993.
- JENKINS, R.R. Exercise and oxidative stress methodology: a critique. *Am J Clin Nutr.*;72:670-4. 2000.
- JHA, N. et al. Glutathione depletion in PC12 results in selective inhibition of mitochondrial complex I activity: implications for Parkinson's disease. *J Biol Chem*, 275:26096–27001, 2000.
- JOLITHA, A.B. SUBRAMANYAM, M.V.V; ASHA DEVI, S. Modification by vitamin E and exercise of oxidative stress in gerions of aging rat brain: Studies on superoxide dismutase isoenzymes and protein oxidation status. *Experimental Gerontology*. 41, 753-763. 2006.
- JOERGENSEN, E. et al. High familial risk for mood disorder is associated with low dorsolateral prefrontal cortex serotonin transporter binding. *Neuroimage.*, 46:360-6, 2009256-60, 2008.
- JOHNSON, I. T. New approaches to the role of diet in the prevention of cancers of the alimentary tract. *Mutat. Res.*, 551:9-28, 2004.
- JOHANSSON, C.; AHLENIUS, S. Evidence for the involvement of 5-HT1A receptors in the mediation of exploratory locomotor activity in the rat. *Journal of psychopharmacology*, v. p. 32-35, 1989.
- JOLAS, T. et al. Are postsynaptic 5-HT<sub>1A</sub> receptors involved in the anxiolytic effects of 5-HT<sub>1A</sub> receptors agonists and their inhibitory effects on the firing of serotonergic neurons in the rat? *J. Pharm. Exp. Ther.*, III: 920-9, 1995.
- JOLITHA, A.B. et al. Modification by vitamina E and exercise of oxidative stress in regions of aging rat brain: Studies on superoxide dismutase isoenzymes and protein oxidation status. *Experimental Gerontology* 2006.
- JONES, D.P. Radical-free biology of oxidative stress. *Am J Physiol Cell Physiol*;295:C849–C868, 2008.
- JORDÃO, J.A.F. et al. Peroxidação Lipídica e Etanol: papel da Glutathiona Reduzida e da vitamina E. *Medicina, Ribeirão Preto*.p. 434-49,1998.
- KARL, T.; PABST, R.; VON HÖRSTEN, S. Behavioral phenotyping of mice in pharmacological and toxicological research. *Experimental and toxicologic pathology : official journal of the Gesellschaft für Toxikologische Pathologie*, v. 55, n. 1, p. 69–83, 2003.
- KHANZODE, S.D.; DAKHALE, N. et al. Oxidative damage and major depression: the potential antioxidant action of selective serotonin re-uptake inhibitors. *Redox Rep* 8(6): 365 370, 2003.

- KIDD, P.M. Parkinson's disease as a multifactorial oxidative neurodegeneration: implications for integrative management. *Altern Med Rev*, 5:502-545, 2000.
- KIM, C.H. et al. Functional gene variation in the human norepinephrine transporter: association with attention deficit hyperactivity disorder. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1129, 2008.
- KIM, T.D.; KIM, J.S. et al. Rhythmic serotonin N-acetyltransferase mRNA degradation is essential for the maintenance of its circadian oscillation. *Mol Cell Biol*25(8): 3232-3246, 2005.
- KIM, T.; KIM, C.; SEO, J. Effects of colostrum serum on the serotonergic system in the dorsal raphe nuclei of exercised rats. *J Exerc Nutrition Biochem.*;21(1):033-039. 2017.
- KIM, J.; RURAK, D.W. et al. Stereoselective pharmacokinetics of fluoxetine and norfluoxetine enantiomers in pregnant sheep. *Drug Metab Dispos*, Baltimore, v. 32, p 212-22, 2003.
- KIM, J. et al. Stereoselective disposition of fluoxetine and norfluoxetine during pregnancy and breast-feeding. *Br J Clin Pharmacol*, Oxford, v.61, p. 155-163, 2005.
- KLOTZ, L.O. Oxidant-induced signaling: effects of peroxynitrite and singlet oxygen. *Biol Chem*; 383:443–456, 2002.
- KNAEPEN, K. et al. Neuroplasticity - exercise-induced response of peripheral brain-derived neurotrophic factor: a systematic review of experimental studies in human subjects. *Sports Medicine*, v. 40, n. 9, p.765-801, 2010.
- KOLLA, N. et al. Amitriptyline and fluoxetine protect PC2 cells from cell death induced by hydrogen peroxide. *J Psychiatry Neurosci* 30: 196–201, 2005.
- KORZENIEWSKI, B.; ZOLADZ, J.A. Biochemical background of the VO<sub>2</sub> on-kinetics in skeletal muscles. *J. Physiol. Sci.*; 1: 1-12, 2006.
- KRANZ, G.S.; KASPER, S. et al. Reward and the serotonergic system. *Neuroscience* 166(4): 1023-1035.
- KURT, M.; ARIK, A.C.; CELIK, S. Os efeitos da sertralina e da fluoxetina na ansiedade no labirinto positivo elevado em ratinhos. *J Basic Clin Physiol Pharmacol*. 11 : 173-180, 2000.
- KWADIJK, S.; TORAÑO, J. S. High-performance liquid chromatographic method with ultraviolet detection for the determination of dapsone and its hydroxylated metabolite in human plasma. *Biomed. Chromatogr.*, v. 16, p. 203–208, 2002.
- LAGERCRANTZ, H. Hans Spemann (1869-1941): discoverer of the neuronal organizer. *Acta Paediatr* 95(4): 386-387, 2006.

- LANCHA, A.H. et al. Efeito da suplementação de aspartato, asparagina e carnitina na dieta sobre o metabolismo do músculo esquelético durante um exercício moderado. *Physiol.Behav.*; 57 : 367-371.1995.
- LAN, X. Effect of treadmill exercise on 5-HT, 5-HT1A receptor and brain derived neurotrophic factor in rats after permanent middle cerebral artery occlusion. *Neurol Sci.* 35:761-6, 2014.
- LAPORTE, A.M. Selective in vivo labelling of brain 5HT1A receptors by [3H]WAY 100635 in the mouse. *European Journal Pharmacology*, 271, 505-514. 1994.
- LAUFER, Y. The effects of exercise and neuromuscular electrical stimulation in subjects with knee osteoarthritis: a 3-month follow-up study. *Clin. Interv. Aging* 9: 1153-1161. 2014.
- LAU, J.Y.F. PINE, D.S. Elucidating risk mechanisms of gene–environment interactions on pediatric anxiety: integrating findings from neuroscience. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci.* 258: 97–106, 2008.
- LEIBOWITZ, S. F; WEISS, G. F; SUH, J. S. Medial hypothalamic nuclei mediate serotonin's inhibitory effect on feeding behavior. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, v. 37, n. 4, p. 735-42, 1990.
- LEONARDI, E.T.; AZMITIA, E.C. Inibição de MDMA (ecstasy) de MAO tipo A e tipo B: comparações com fenfluramina e fluoxetina (Prozac) *Neuropsychopharmacology.* 10 : 231-238, 1994.
- LESCH, K. P.; D. BENDEL, et al. Association of anxiety-related traits with a polymorphism in the serotonin transporter gene regulatory region." *Science* 274(5292): 1527-1531, (1996).
- LESLIE, R.A. et al. Efeitos do tratamento agudo ou repetido de paroxetina e fluoxetina sobre o comportamento afetivo em ratos adolescentes e adultos. *Psicofarmacologia (Berl).* Oct. 232 (19): 3515-3528, 2015.
- LI, G.F. et al. Effects of high intensity exhaustive exercise on SOD, MDA, and NO levels in rats with knee osteoarthritis. *Genet Mol Res.* Oct 16;14(4):12367-76. 2015.
- LISOVSKAYA. et al. Clotrimazole enhances lysis of human erythrocytes induced by t-BHP. *Chemico-Biological Interactions.*, v. 180, p. 433–439, 2009.
- LIU, R. et al. Iron toxicity in organotypic cultures of hippocampal slices: role of reactive oxygen species. *J. Neurochem.* 2: 492-502.2003.
- LIU, J. et al. A administração aguda de leptina produz efeitos de tipo ansiolítico: uma comparação com a fluoxetina. *Psicofarmacologia (Berl).* 207 : 535-545,2010.
- LIU, L et al. Protective effects of tea polyphenols on exhaustive exercise-induced fatigue, inflammation and tissue damage. *Food Nutr Res.*; 1;61(1):1333390. 2016.

- LIU, W. et al. Excitotoxicity and oxidative damages induced by methylmercury in rat cerebral cortex and the protective effects of tea polyphenols. *Environmental toxicology*, v. 29, n. 3, p. 269–83, 2011.
- LOUREIRO, A.P.M.; MASCIO, P.D.; MEDEIROS, M.H.G. Exocyclic DNA adducts: implications in mutagenesis and carcinogenesis. *Quimica Nova*. 25(5):777-793. 2002.
- LUNEC, J. et al. Urinary 8-oxo-2'-deoxyguanosine: redox regulation of DNA repair in vivo. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 33, n. 7, p. 875-885, 2002.
- MACHADO, et al. Efeito do exercício na hipertensão renovascular crônica em ratos. *Revista Brasileira de Fisioterapia*, São Carlos, v.4, n.1, p.11-17, 1999.
- MACKENZIE, J.W. Daycase anaesthesia and anxiety. A study of anxiety profiles amongst patients attending a Day Bad Unit. *Anaesth. Oxford*, 44(5): 437-440, 1989
- MAES, M. et al. Lower serum vitamin E concentrations in major depression. Another marker of lowered antioxidant defenses in that illness. *J. Affect Disord.*, 58:241-6, 2000.
- MAHSEREDJIAN, F. et al. Estudo comparativo de métodos para a predição do consumo máximo de oxigênio e limiar anaeróbio em atletas. *Revista Brasileira de Medicina do Esporte*, 5(5):167-172, set.-out. 1999.
- MAJANO, P.L.; MEDINA, J. et al. N-Acetyl-cysteine modulates inducible nitric oxide synthase gene expression in human hepatocytes, *J Hepatol*. 40(4):632-7, 2004.
- MANNERVIK, B. *Methods in Enzymology: Glutathione peroxidase*; Academic Press, New York. Vol. 113; p 490.1985.
- MANNERVIK, B. Glutathione peroxidase. *Methods Enzymol.*, v.113, p.490 495. 1985.
- MANFREDINI, V. et al. Simvastatin Treatment Prevents Oxidative Damage to DNA in Whole Blood Leukocytes of Dyslipidemic Type 2 Diabetic Patients. *Cell Biochemistry and Function*.28:360-366, 2010.
- MARNETT, L. J. Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde. *Mutat. Res*. v. 424, p.83–95, 1999.
- MASON, S.S. et al. Differential sensitivity to SSRI and tricyclic antidepressants in juvenile and adult mice of three strains. *Eur J Pharmacol*; 602:306–315, 2009.
- MCARDLE, W.D.; KATCH, F.I. et al. *Fisiologia do exercício: energia, nutrição e desempenho humano*. 6a Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.
- MCCORD, J; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase an enzymic function for erythrocyte (hemocuprein). *The Journal of Biological Chemistry*., v.244, n.2, p.6049-6055, 1969.



- MEEUSEN, R. et al. Effects of tryptophan and/or acute running on extracellular 5-HT and 5HIAA levels in the hippocampus of food-deprived rats. *Brain Research*, v. 740, p. 245-252, 1996.
- MEISTER, A. Metabolism and function of glutathione: an overview. *Biochemical Society transactions*, v. 10, n. 2, p. 78–9, 1982.
- MELLO, M.A.R. Effect of exercise during pregnancy and damage on maternal blood chemistry and fetal growth. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, Ribeirão Preto, v.25, n.5, p.537-542, 1992.
- MENARD, J.; TREIT D. The septum and the hippocampus differentially mediate the anxiolytic effects of R(+)-8-OH-DPAT. *Behavioural Pharmacology*, 9, 93-101. 1998.
- MERGEL, M. Selective Serotonin Reuptake Inhibitors. *Toxicopedia*, Sep 2011.
- MEZADRI, T.J. et al. Repeated rat-forced swim test: Reducing the number of animals to evaluate gradual effects of antidepressants. *Journal of Neuroscience Methods*, v. 195, p. 200–205, 2011.
- MINNEMAN, K.P. et al. *Brody's Human Pharmacology*, 4<sup>th</sup>ed. Elsevier, 2006.
- MIZUNO, T.K. *Agaricus blazei* Murrill medicinal and dietary effects. *Food Rev Int*, 11:167–72, 1995.
- MOILANEN, E.; VAPPATALO, H. Nitric oxide in inflammation and immune response. *Ann. Med.*, 27: 359-67, 1995.
- MONCADA, S. et al. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol. Reviews*, 43(2): 109-42, 1991.
- MONTEIRO, H. M. C. et al. Physical exercise versus fluoxetine: antagonistic effects on cortical spreading depression in Wistar rats. *European Journal of Pharmacology*, v. 762, n.5, p. 49-54, 2015.
- MORETTI, M.; BUDNI, J. et al. Protective Effects of Ascorbic Acid on Behavior and Oxidative Status of Restraint-Stressed Mice. *J Mol Neurosci*. 2012.
- MOREL, C. M. Multidrug therapy against leprosy. Development and implementation over the past 25 years, In: World Health Organization, Geneva, 2004.
- MORGAN, W.P. Influence on acute physical activity on state anxiety. *NCPEAM. Proceedings*, 113-121, 1973.
- MORGAN, M. J.; KIM, Y. S.; LIU, Z. Lipid rafts and oxidative stress-induced cell death. *Antioxid. Redox Signal.*, 9:1471-1483. 2007.
- MOSER, E.I.; MOSER, M.B; ANDERSEN, P. Spatial learning impairment parallels the magnitude of dorsal hippocampal lesions, but is hardly present following ventral lesions. *J Neurosci* ;13:3916–25. 1993.

- MOTTA, V.T. Bioquímica Clínica: Princípios e interpretações, 3° ed. Medbook. Porto Alegre, 2000.
- MOTA, J; RIBEIRO, J. L; CARVALHO, J. Atividade física e qualidade de vida associada à saúde em idosos participantes e não participantes em programas regulares de atividade física. Rev. bras. Educ. Fís. Esp., São Paulo, v.20, n.3, p.219-25, jul./set. 2006.
- MUCK-SELLER, D.; JEVRIC-CAUSEVIC, A.; DIKSIC, M. Influence of fluoxetine on regional serotonin synthesis in the rat brain. Journal of Neurochemistry, Washington, v.67, n.2, p.434-42, 1996.
- MIYAZAKI, H. et al. Strenuous endurance training in humans reduces oxidative stress following exhausting exercise. Eur J Appl Physiol. 84;1-6 2001.
- NAHAS, T. R. O teste do Campo Aberto. Departamento de Fisiologia, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, 2001.
- NATHAN, C. XIE, Q.W. Regulation of biosynthesis of nitric oxide. *J Biol Chem*, 269: 13725-13728. 1994.
- NEMEROFF, C.B.; OWENS, M.J. The role of serotonin in the pathophysiology of depression: as important as ever. Clin Chem.;55:1578–1579.2009.
- NEWSHOLME, E.A. Physical and mental fatigue: metabolic mechanisms and importance of plasma amino acids. Br Med Bull. 48:477-495.1992.
- NG, F. et al. Oxidative stress in psychiatric disorders: evidence base and therapeutic implications. Int. J. Neuropsychopharmacol., 11:851-76, 2008.
- NI, W.; WATTS, S.W. 5-hydroxytryptamine in the cardiovascular system: focus on the serotonin transporter(SERT). Clin Exp Pharmacol Physiol, v.33, n. 7, p. 575-83, Jul, 2006.
- NIE, J. et al. Biomarcadores de soro de músculo cardíaco e esquelético nos corredores adolescentes. Scand J Med Sci Sports.; 21 (5): 625-629. 2011.
- NOAKES, T.D. Linear relationship between the perception of effort and the duration of constant load exercise that remains. J Appl Physiol (1985). 96:1571-1572. 2004.
- NOVIO, S. et al. Effects of fluoxetine on the oxidative status of peripheral blood leucocytes of restraintstressed mice. Basic Clin Pharmacol Toxicol 109: 365–371, 2011.
- NUNES, E. A.; FERNANDES, L. C. Exercício agudo versus imunossupressão: talvez apenas outro mecanismo homeostático. Revista Brasileira de Prescrição e Fisiologia do Exercício, São Paulo, v.3, n.15, p.312-324, 2009.
- NUNEZ-MILLACURA, C. An oxidative stress-mediated positive-feedback iron uptake loop in neuronal cells. Neurochem. 2; 240-248.2000.

- NUTT, D. J. The pharmacology of human anxiety. *Pharmacology Therapeutics*, nº 47, p. 233-266, 1990.
- NUTH, A. G. et al. Prática de atividade física e sedentarismo em brasileiros: resultados da Pesquisa Nacional por Amostra de Domicílios (PNAD), 2008. *Ciência & Saúde Coletiva*, 16 (9): 3697-3705, 2011.
- O'CONNOR, P.J. et al. Anxiety responses to maximal exercise testing. *Br J Sports Med.*, 29;97-102,1995.
- OH, J.E. et al. Resposta ansiogénica paradoxal de ratinhos juvenis à fluoxetina. *Neuropsicofarmacologia*. 34 : 2197-2207, 2009.
- OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.*, v. 95, p. 351–358, 1979.
- O'KANE, M.; WILES, P. G.; WALES, J. K. Fluoxetine in the treatment of obese type 2diabetic patients. *Diabetes Med* 1994.
- OSTROWSKI, K. et al. Pro-and anti-inflammatory cytokine balance in strenuous exercise in humans. *J Physiol.*;515(Pt 1):287–291.1999.
- OWENS, M.J.; KNIGHT, D.L.; NEMEROFF, C.B. Second-generation SSRIs: human monoamine transporter binding profile of escitalopram and R-fluoxetine. *Biological Psychiatry*, 50(5), pp. 345-350, 2001.
- PANDOLFO, P. et al. Increased sensitivity of adolescent spontaneously hypertensive rats, an animal model of attention deficit hyperactivity disorder, to the locomotor stimulation induced by the cannabinoid receptor agonist WIN 55,212-2. *European journal of pharmacology*, v. 563, n. 1-3, p. 141–8, 2007.
- PAPAZOGLU, I. K. et al. Hippocampal GSK3 $\beta$  as a molecular link between obesity and depression. *Molecular Neurobiology*, v. 52, n. 1, p. 363-74, 2015.
- PARKER, L.; CADENAS, E.; MARCEL, D; Oxidative stress and the mitochondrial theory of aging in human skeletal muscle. *Exp Gerontol*, 39: 1391-1400. New York, 305–372. (2004).
- PARKER, G.; BROTHIE, H. Diferenças de gênero na depressão. *Int. Rev Psiquiatria*. 22 : 429-436, 2010.
- PAZOS. A, PALACIOS. J. Quantitative autoradiographic mapping of serotonergic receptors in the rat brain. I. Serotonin-1 receptors. *Brain Res* 346:205–230, 1985.
- PAZOS, A; CORTÉS, R.; PALACIOS, J.M. Quantitative autoradiographic mapping of serotonin receptors in the rat brain. II. Serotonin-2 receptors. *Brain Res*. 4;346(2):231-49, 1985.
- PAZOS, A.; PROBST, A.; PALACIOS, J.M. Serotonin receptors in human brain. III: Autoradiographic mapping of serotonin-1 receptors. *Neuroscience*, 1, 97-122. 1987.

PELLOW S, CHOPIN P, FILE SE, BRILEY M. Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *Journal Neuroscience Methods*, v. 14, p. 149-167, 1985.

PELLOW, S.; FILE, S. E. Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in an elevated plus-maze: A novel test of anxiety in the rat. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, v. 24, n. 3, p. 525–529, 1986.

PENNA, G. O. Leprosy: the need to employ evidence-based medicine in control policies around the world. *Lepr. Rev.*, v.82, p. 210-212, 2011.

PERCÁRIO, S.; VITAL, A.; JABLONKA, F. Dosagem do malondialdeído. *Newslab.*, v. 2, n 6, p. 46-50, 1994.

PERCARIO, S. et al. Antioxidant Activity of Edible Blushing Wood Mushroom, *Agaricus sylvaticus* Schaeff. (*Agaricomycetidae*) In Vitro. *Int. J. Med.Mushr.*, v. 11, n. 2, p. 133-139, 2009.

PEREIRA, B.; SOUZA JÚNIOR, T. P. *Metabolismo celular e exercício físico: aspectos bioquímicos e nutricionais*. São Paulo: Phorte Editora, 2004.

PEROVIĆ, B. et al. Getting the balance right: Established and emerging therapies for major depressive disorders. *Neuropsychiatr. Dis. Treat.*, 6:343-64, 2010.

PIETROPAOLOS, S. et al. The impact of voluntary exercise on mental health in rodents. A neuroplasticity perspective. *Behav Brain Res*. 192-:42-60.2008.

PILAR-CUÉLLAR, F.; VIDAL, R.; PAZOS, A. Subchronic treatment with fluoxetine and ketanserin increases hippocampal brain-derived neurotrophic factor, b-catenin and antidepressant-like effects. *The Authors British Journal of Pharmacology*, 2011.

POBBE, R.L.H.; ZANGROSSI, H. 5-HT 1A and 5-HT 2A receptors in the rat dorsal periaqueductal gray mediate the antipanic-like effect induced by the stimulation of serotonergic neurons in the dorsal raphe nucleus. *Psychopharmacology* 183, 314–321. 2005

POBBE, R.L.H.; ZANGROSSI, H.; BLANCHARD, D.C.; BLANCHARD, R.J. Involvement of dorsal raphe nucleus and dorsal periaqueductal gray 5-HT receptors 136 in the modulation of mouse defensive behaviors. *European Neuropsychopharmacology* 21, 306–315. 2011.

POLOTOW, T.G. et al. Astaxanthin supplementation delays physical exhaustion and prevents redox imbalances in plasma and soleus muscles of Wistar rats. *Journal List Nutrients* v.6(12); Dec PMC4277001. 2014.

PORSOLT, R. D.; LE PICHON, M.; JALFRE, M. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature*, v. 266, n. 5604, p. 730– 732, 1977.

POTENZA, M.A. et al. Chronic treatment with epigallocatechin gallate reduces motor hyperactivity and affects in vitro tested intestinal motility of spontaneously hypertensive rats. *Food Nutr Res.*;60:28373. 2016.

- PRAKASH, R.; SINGAPALLI, T.; GOKULNATH. Review of oxidative stress in relevance to uremia. *Clinical Queries: Nephrology*, v. 1, n. 3, p. 215–221, jul. 2012.
- PRATT, J.A. The neuroanatomical basis of anxiety. *Pharmacol. The*, 55: 149, 18,1992.
- PROZAC: cloridrato de fluoxetina. Farm. Resp.: Márcia A. Preda – CRF-SP nº 19189. São Paulo: ELI LILLY DO BRASIL LTDA, 2016. Bula de remédio.
- PRUT. L.; BELZUNG, C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *European Journal of Pharmacology*, 3-33, 2003.
- PYSH, J.J.; WEISS, G. M. Exercise during development induces an increase in Purkinje cell dendritic tree size. *Science*, v. 206, p. 230-232, 1979.
- QU, Y.; ALUISIO L. et al. "Pharmacokinetics and pharmacodynamics of norfluoxetine in rats: Increasing extracellular serotonin level in the frontal cortex." *Pharmacol Biochem Behav* 92(3): 469-473. 2009.
- RACAGNI,G.; POPOLI M. The pharmacological properties of antidepressants. *Int Clin Psychopharmacol*.2010;25:117–131.2010.
- RADÁK, Z. et al. Acute bout of exercise does not alter the antioxidant enzyme status and lipid peroxidation of rat hippocampus and cerebellum. *Pathophysiology* 2: 243-245. 1995.
- RADÁK, Z. et al. Superoxide dismutase derivative reduces oxidative damage in skeletal muscle of rats during exhaustive exercise. *J Appl Physiol*. 79: 129-135.1995
- RADAK, Z. et al. The effect of exercise training on oxidative damage of lipids, proteins, and DNA in rat skeletal muscle: evidence for beneficial outcomes. *Free Radical Biology & Medicine*, New York, v.27, n.1/2, p.69-74, 1999.
- RADAK, Z. et al. Regular exercise improves cognitive function and decreases oxidative damage in rat brain. *Neurochemistry International*, v. 38, n. 1, p.17-23, 2001.
- RADAK, Z.; et al. oxidative stress and hormesis. *Ageing Res Rev.*;7(1):34–42. 2008.
- RADI R. Peroxynitrite, a stealthy biological oxidant. *J Biol Chem*; 288:26464–26472, 2013.
- RAHMAN, I. et al. Is there any relationship between plasma antioxidant capacity and lung function in smokers and in patients with chronic obstructive pulmonary disease? *Thorax*, v. 55, n.3, p.189-93, 2000.
- RAMOS, A.; MORMÈDE, P. Stress and Emotionality: a Multidimensional and Genetic Approach. *Neurosci Biobehav Rev* 22:33-57, 1998.

RAMMAL H. et al. The impact of high anxiety level on the oxidative status of mouse peripheral blood lymphocytes, granulocytes and monocytes. *Eur J Pharmacol* 589: 173–175. 2008.

READ, S.J.; PARSONS, A.A. Sumatriptan modifies cortical free radical release during cortical spreading depression. A novel antimigraine action for sumatriptan. *Brain Research*, v. 870, n. 1-2, p. 44-53, 2000.

REHMAN, H. U. Methemoglobinemia. *Ewj.m.*, 2001. v. 175, p. 193-196.

REILLY, T. P.; WOSTER, P. M.; SVENSSON, C. K. Methemoglobin formation by hydroxylamine metabolites of sulfamethoxazole and dapsona: Implications for differences in adverse drug reactions. *The journal of pharmacology and experimental therapeutics.*, v. 288, p. 951–959, 1999.

RES nº 1000, CFMV de 11 de maio de 2012. Dispõe sobre procedimentos e métodos de eutanásia em animais e dá outras providências. O Conselho Federal de Medicina Veterinária no uso das atribuições lhe conferidas pelo artigo 16, alínea 'f', da Lei nº 5.517, de 23 de outubro de 1968.

RÉUS, G.Z. et al. The administration of olanzapine and fluoxetine has synergistic effects on intracellular survival pathways in the rat brain. *J Psychiatr Res* 46: 1029–1035. 2012.

RHIM, Y.T. Effect of *Acanthopanax senticosus* on 5-hydroxytryptamine synthesis and tryptophan hydroxylase expression in the dorsal raphe of exercised rats. *J Ethnopharmacol.* 114:38-43. 2007.

RICHARD, D.; HOLLENDER, P.; CHÉNAIS, B. Involvement of reactive oxygen species in aclarubicin-induced differentiation and invasiveness of HL-60 leukemia cells. *International Journal of Oncology.*, v. 21, p. 393–399, 2002.

RIBAS, G. S. et al. Reduction of lipid and protein damage in patients with disorders of propionate metabolism under treatment: a possible protective role of L-carnitine supplementation. *International Journal of Developmental Neuroscience.* 28:127-132, 2010.

RISCH, S. C.; NEMEROFF, C. B. Neurochemical alterations of serotonergic neuronal systems in depression. *J. Clin. Psychiatry.* 53:3-7, 1992.

RODGERS, R.J. Anxiogenic-like effects of fluprazine and eltoprazine in the mouse elevated plus-maze: profile comparisons with 8-OH-DPAT, CGS12066B, TFMPP and mCPP. *Behavioural Pharmacology*, 3, 621-634. 1992.

ROGÓZ, Z; SKUZA, G. Anxiolytic-like effects of olanzapine, risperidone and fluoxetine in the elevated plus-maze test in rats. *Pharmacological Reports.* V. 63, p. 1547-1552. 2011.

ROSS, D.; MOLDEUS, P. Antioxidant defense systems and oxidative stress. In Vigo Pelfrey C (ed): *Membrane lipid oxidation.* 1th ed. Boca Raton, CRC Press, 151-70, 1991.

- RUFINO, M.S.M. et al. Determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH. Comunicado Técnico Embrapa, 127: 1-4, 2007.
- SAKR, H.F. et al. Effect of fluoxetine and resveratrol on testicular functions and oxidative stress in a rat model of chronic mild stress-induced depression. *J Physiol Pharmacol.* Aug;66(4):515-27.2015, 66, 4, 515-527, 2015.
- SANCHEZ, S. et al. Circadian variations of serotonin in plasma and different brain regions of rats. *Mol Cell Biochem*, v. 317, n. 1-2, p. 105-11, Oct 2008.
- SANDLER, M.; REVELEY, M.A. et al. Human platelet monoamine oxidase activity is health and disease: a review. *J Clin Pathol* 34(3): 292-3-2, 1981.
- SACHDEV, S. DAVIES, K.J. Production, detection, and adaptive responses to free radicals in exercise. *Free Radic Biol Med.* 2008;44(2):215–223.2007.
- SANTOS, F.H. Funções executivas. In: Andrade VM, Santos F, Bueno OFA. *Neuropsicologia Hoje*. São Paulo: Artes Médicas; 2004.
- SANTOS, T. et al. Behavioral interactions of simvastatin and fluoxetine in tests of anxiety and depression. *Neuropsychiatr Dis Treat.* V. 8: 413–422, 2012.
- SARANDOL, A.; SARANDOL, E. et al. Major depressive disorder is accompanied with oxidative stress: short-term antidepressant treatment does not alter oxidative–antioxidative systems. *Hum. Psychopharmacol. Clin. Exp.*, 22:67-73, 2007.
- SAKR, H.F. et al. Effect of fluoxetine and resveratrol on testicular functions and oxidative stress in a rat model of chronic mild stress-induced depression. *Journal of Physiology and Pharmacology*, 66, 4, 515-527, 2015.
- SASTRE, J. et al. Exhaustive physical exercise causes and oxidation of glutathione status in blood. Prevention by antioxidant administration. *Am. J. Physiol.* 263, 992–995, 1992.
- SCHALCHER, T.R. et al. Clinical Oxidative Stress during Leprosy Multidrug Therapy: Impact of Dapsone Oxidation. *PLOS ONE.* 9(1): e 85712, 2014.
- SCHREIBER, R; DE VRY, J. 5-HT<sub>1A</sub> receptor ligands in animal models of anxiety, impulsivity and depression: multiple mechanisms of action? *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.*: 17(1):87-104, 1993.
- SCHIFFER, R.B. Distúrbios Psiquiátricos na Prática Médica. *Tratado de Medicina Interna*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 21 ed, vol 2, p. 2285 2295, 2001.
- SCMIDT, H.H.H.W.; WALTER, U. NO at work. *Cell.* 78: 919-925.1994.
- SEN, C.K. homeostase de glutathiona em resposta ao treinamento físico e suplementos nutricionais. *Mol Cell Biochem*; 196: 31-42. 1999.
- SEN, C.K.; PACKER, L. Thiol homeostais and supplements in physical exercise. *Am. J. Nutr.* 72, 653-669. 2000.

- SEO J.H. et al. Effects of *Phellinus linteus* administration on serotonin synthesis in the brain and expression of monocarboxylate transporters in the muscle during exhaustive exercise in rats. *J Nutr Sci Vitaminol.*; 57:95-103.2011.
- SGHENDO, L.; MIFSUD, J. Understanding the molecular pharmacology of the serotonergic system: using fluoxetine as a model. *Journal of Pharmacology*, v. 64, n. 3, p. 317-25, 2012.
- SHAN, X.; AW, T.Y.; JONES, D.P. Glutathione-dependent protection against oxidative injury. *Pharmacology and Therapeutics*, v.47, n.1, p.61-71, 1990.
- SHARP, T.; COWEN, P. J. 5-HT and depression: is the glass half-full? *Current Opinion in Pharmacology*, v. 11, n. 1, p. 45–51, 2011.
- SIES, H. Oxidative stress: introductory remarks. In: Sies H, editor. *Oxidative stress*. New York: Academic Press; p 1-8, 1985.
- SIES, H. Biochemistry of oxidative stress. *Angewandte Chemie International Edition*, Weinheim, v. 25, n. 12, p. 1058-1071, 1986.
- SIES, H. Strategies of antioxidant defence: review. *Eur J Biochem*, v.215, p.213-219, 1993.
- SIES, H.; STAHL, W. Vitamins E and C, carotene and other carotenoids as antioxidants. *The American Journal of Clinical Nutrition*, v.62, supl, p.315S- 1321S, 1995.
- SIES, H. JONES, D.P. Oxidative stress. In: Fink G, editor. *Encyclopedia of stress*. Vol.3,2nd ed. Oxford: Academic Press; p. 45–48, 2007.
- SINGH, A. K. Role of nitric oxide in immunity – a review. *Wayamba Journal of Animal Science*, Makandura, 2011.
- SILVA, R.C. BRANDÃO, M.L. Efeitos agudos e crônicos de gepirona e fluoxetina em ratos testados no labirinto positivo elevado: uma análise etológica. *Pharmacol Biochem Behav.* 65 : 209-216, 2000.
- SILVA, M.C.; MELLA, E.A.C. Avaliação do uso de anorexígenos por acadêmicas de uma instituição de ensino superior em Maringá, PR. *Arq. Ciência Saúde Unipar*, v. 12, n.1, p 43-50, 2008.
- SILVA, R. S. Atividade física e qualidade de vida. *Ciência & Saúde Coletiva*. 15 (1): 115-120, 2010.
- SITTA, A. Evidence that DNA damage is proportional to phenylalanine blood levels in leukocytes from phenylketonuric patients. *Mutation Research. Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 679:13-16, 2009.
- SMALL, D. M. et al. Oxidative stress, anti-oxidant therapies and chronic kidney disease. *Nephrology (Carlton, Vic.)*, v. 17, n. 4, p. 311–21, 2012.



- SOARES, D.D. et al. Tryptophan-induced central fatigue in exercising rats is related to serotonin content in preoptic area. *Neurosci Lett.*;415:274-278. 2007.
- SODIN, B.; WESTING, Y. H.; APPLE, F. S. Biochemical mechanisms for oxygen free radicals formation during exercise. *Sports Medical*, v. 10, n. 4, p. 236-254, 1990.
- SOUZA, M.E. Effect of fluoxetine on rat liver mitochondria. In *Biochem Pharmacol*, vol. 48, pp. 535-541. Englnad.1994.
- SPICKETT, D.M.; PITT, A.wesR. Protein oxidation: role in signaling and detection by mass spectrometry. *Amino Acids.*;42:5–21. 2012.
- SPROUSE, J.S. AGHAJANIAN, G.K. Electrofisiológicos respostas de neurónios do rafe dorsal serotoninérgicos para 5-HT<sub>1A</sub> e 5-HT<sub>1B</sub> agonistas. *Synapse* 1987;
- STARKE, K.; GOTHERT, M. et al. Modulation of neurotransmitter release by presynaptic autoreceptors. *Physiol Rev* 69(3): 864-989, 1989.
- STEELS, E. L.; LEARMONTH, R. P.; WATSON, K. Stress tolerance and membrane lipid insaturation in *Saccharomyces cerevisiae* grown aerobically or anaerobically. *Microbiology*, v. 140, p. 569-576, 1994.
- STEINACKER, J.M. et al. New aspects of the hormone and cytokine response to training. *Eur J Appl Physiol.*;91(4):382–391. 2004.
- STEPNIAK -INKIELEWICZ, I. Impact of fluoxetine on liver damage in tars. *Pharmacol Rep* 63(2): 441-447, 2011.
- STEPHEN, M.S. *Psychopharmacology of antidepressants*. Editora Martin Dunitz, 7-9 Pratt Street, London NW1, Reino Unido 1997.
- STOUT, J.C.; WEISS, J.M. An animal model for measuring behavioral responses to anxiogenic and ansiolytic manipulation. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, v. 47, p.459-465, 1994.
- STRECKER, R. E.; THAKKAR. M. M. et al. "Behavioral state-related changes of extracellular serotonin concentration in the pedunculo pontine tegmental nucleus: a microdialysis study in freely moving animals." *Sleep Res Online* 2(2): 21-27, 1999.
- STRUDER, H.K.; WEICKER H. Physiology and pathophysiology of the serotonergic system and its implications on mental and physical performance: Part I. *Int J Sports Med.*; 22:467. 2001.
- STUEHR, D.J. Purification and characterization of the cytokine-induced macrophage nitric oxide synthase: an FAD- and FMN-containing flavoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA*. 88: 1991.
- SULTANA, R.; PERLUIGI, M.; ALLAN BUTTERFIELD, D. Lipid peroxidation triggers neurodegeneration: a redox proteomics view into the Alzheimer disease brain. *Free Radic Biol Med*, v. 62, p. 157-69, 2013.

- SUNG, Y.H. et al.  $\beta$ -Glucan increases treadmill running time through inhibition of serotonin expression in brains of rats during exhaustive exercise. *JENB*. 15:95-103. 2011.
- SUREDA et al. Effects of exercise intensity on lymphocyte H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production and antioxidant defences in soccer players. *Br J Sports Med*. Mar;43(3):186-90. 82. 2009.
- SUZUKI, M.; KATAMINE, S.; TATSUMI, S. Exercise-induced enhancement of lipid peroxide metabolism in tissues and their transference into the brain in rat. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*;29(2):141-51. 1983.
- SUREDA, A. et al. Effects of exercise intensity on lymphocyte H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production and antioxidant defences in soccer players. *Br J Sports Med*. Mar;43(3):186-90. 82. 2009.
- SZABÓ, C. Alterations in nitric oxide in various forms of circulatory shock. *New Horizons*, 3(1): 2-32, 1995.
- TANNER, M.J.; Band 3 anion exchanger and its involvement in erythrocyte and kidney disorders. *Curr Opin Hematol* 9:133-139. 2002.
- THOMPSON, D. et al. Prolonged vitamin C supplementation and recovery from demanding exercise. *Int J Sport Nutr Exerc Metab*.;11(4):466–481. 2001.
- THOMPSON, M.R. et al. O tratamento com fluoxetina crônica atenua parcialmente a ansiedade de longo prazo e os sintomas depressivos induzidos pela MDMA ("ecstasy") em ratos. *Neuropsicofarmacologia*. 29 : 694-704. 2004.
- TOSCANO, P.R.; ROTTA, C.T. Estresse e Doenças Cardiovasculares. In: Porto CC, Porto AL. Doenças do coração prevenção e tratamento. 2<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro, Guanabara, p.119-125, 2005.
- TRELUYER, J.M.; JACQZ-AIGRAIN, E. Expression of CYP2D6 in developing human liver. *Eur J Biochem* 202:583–588, 1991.
- TROUVIN, J.H. Tempo de metabolismo da serotonina cerebral após cessação do tratamento de fluoxetina a longo prazo no rato. *Life Sci*. 52 : 187-192, 1993.
- TSUBOI, H. et al. Possible connections among job stress, depressive symptoms, lipid modulation and antioxidants. *J. Affect Disord.*, 91:63-70, 2006.
- VAN, E.R.P. et al. Effects of environmental stressors on time course, variability and from of self-grooming in the rat. *Behav. Brain Res.*, v. 65 p. 47-55, 1994.
- VAN KUIJK, F.J.G.M. et al. A new role for phospholipase A<sub>2</sub>: protection of membranes from lipid peroxidation damage. *Trends in Biochemical Sciences*, Amesterdam, v.12, n.1, p.31-43, 1987.
- VASCONCELOS, S. M. L.; GOULART, M. O. F. et al. Espécies Reativas de Oxigênio e de Nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue

humano: principais métodos analíticos para sua determinação. *Química Nova*, v. 5, n. 3, p.1323 – 38, 2007.

VERTES, R.P. A PHA-L analysis of ascending projections of the dorsal raphe nucleus in the rat. *The journal of comparative neurology*, 313, 643-668.1991.

VINA, et al. Free radicals in exhaustive physical exercise: mechanism of production, and protection by antioxidants. *IUBMB Life* 2; 50(4-5):271-7.2000.

VINA, et al.. Mechanism of free radical production in exhaustive exercise in humans and rats; role of xanthine oxidase and protection by allopurinol. *IUBMB Life*; 49(6):539-44.2000.

VOIGT, J.P.; FINK, H. Serotonin controlling feeding and satiety. *Behavioral Brain Research*, v. 277, p. 14-31, 2015.

WALTHER, D.J.; BADER M. A unique central tryptophan hydroxylase isoform. *Biochem Pharmacol.* 66(9): 1673-1680, 2003.

WALTHER D.J. et al. Synthesis of serotonin by a second tryptophan hydroxylase isoform. *Science.* 299(5603): 76, 2003.

WANG, J. et al. Effects of exercise on stress-induced changes of norepinephrine and serotonin in rat hippocampus. *Chinese Journal of Physiology*, v. 56, p. 245-252, 2013.

WANG, Y.; MARDSEN, P.A. Nitric oxide synthases: Biochemical and molecular regulation. *Curr Opin Nephrol Hypert* .4: 12-22. 1995.

WANG, C. et al. Procalcitonin levels in fresh serum and fresh synovial fluid for the differential diagnosis of knee septic arthritis from rheumatoid arthritis, osteoarthritis and gouty arthritis. *Exp. Ther. Med.* 8: 1075-1080. 2014.

WELKER, W. Free versus forced exploration of a novel situation by rats. *Psychol Rep* 3:95 108, 1957.

WEN L. et al. Exercise prevents raphe nucleus mitochondrial overactivity in a rat depression model. *Physiology & Behavior*, v. 132, p. 57-65, 2014.

WHARTIN, RN. Transtornos de Ansiedade. *Tratado de Neurologia*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 11ed, cap 160, p. 1050-1054, 2007.

WHITAKER-AZMITIA, et al. Stimulation of astroglial 5-HT<sub>1A</sub> receptors releases the serotonergic growth factor, protein S-100, and alters astroglial morphology. *Brain Res* 528 (1): 155-158, 1990.

WHO. Depression. World Health Organization. 2011 [cited 2011 Apr 12] Available from [http://www.who.int/mental\\_health/management/depressi](http://www.who.int/mental_health/management/depressi).

WILDE M.I.; BENIELD, P. Fluoxetine. A pharmacoeconomic review of its use in depression. *Pharmacoeconomics* 13: 543–561, 1998.

WINTERBOURN, C.C. Oxidative denaturation in congenital hemolytic anemias: the unstable hemoglobins. *Seminars in Hematology.*, v.27, n.1, p.41-50, 1990.

WISE, C.D.; BERGER, B.D.; STEIN, L.; Evidence of -noradrenergic reward receptors and serotonergic punishment receptors in the rat brain. *Biological Psychiatry* 6, 3–21.1973.

WITHEE, E.D. et al. Effects of Methylsulfonylmethane (MSM) on exercise-induced oxidative stress, muscle damage, and pain following a half-marathon: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *J Int Soc Sports Nutr.*;14: 24. 2017.

WITZTUM, J. L. The oxidation hypothesis of atherosclerosis. *Lancet.* 344:793-795,1994.

WONG, D.T. et al. A selective inhibitor of serotonin uptake lilly 110140, 3-(p-trifluoromethylphenoxy)-n-methyl-3-phenylpropylamine. *Life Sci* 15: 471–479, 1974.

WONG, D.T.; THRELKELD, P.G.; ROBERTSON, D.W. Affinities of fluoxetine its enantiomers and other inhibitors of serotonin uptake for subtypes of serotonin receptors. *Neuropsychopharmacology, New York*, v.5, n.1, p.43-7, 1991.

WONG, D.T.; BYMASTER F.P.; ENGLEMAN E.E. Prozac (fluoxetine, LILLY 110140), the first selective uptake inhibitor and an antidepressant drug: twenty years since its first publication, 1995.

WONG, D.T.; PERRY, K.W.; BYMASTER, F.P. Case history: the discovery of fluoxetine hydrochloride (Prozac). *Nature Reviews Drug Discovery*, v. 4, p. 764-774, 2005.

XIA, Z.; DEPIERRE, J.W.; NASSBERGER, L. Tricyclic antidepressants inhibit IL-6, IL-1beta and TNF-alpha release, 1996.

YANG, T. et al. Alpha-lipoic acid protects against methylmercury-induced neurotoxic effects via inhibition of oxidative stress in rat cerebral cortex. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, v. 39, n. 1, p. 157–166, 2015.

ZAFIR, A. BANU, N. Antioxidant potential of fluoxetine in comparison to Curcuma longa in restraint-stressed rats. *Eur J Pharmacol* 572: 23–3, 2004.

ZAFIR, A.; ARA, A.; BANU, N. In vivo antioxidant status: a putative target of antidepressant action. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry.* 33:220-228, 2009.

ZANGROSSI. H.; GRAEFF, F.G. Behavioral effects of intra-amygdala injections of

GABA and 5-HT acting drugs in the elevated plus-maze. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 27, 2453-2456.1994.

ZHANG, J.R.; ANDRUS, P.K.; HALL, E.D. Age-related regional changes in hydroxyl radical stress and antioxidants in gerbil brain. *J Neurochem.* 61:1649-

1647.1993.ZIFA, E.; FILLION, G. 5-Hydroxytryptamine receptors. *Pharmacological Reviews*, 44: 401-458. (1992).

ZIPSER, Y.; PIADÉ, A.; KOSOWER N.S. Erythrocyte thiol status regulates band 3 phosphotyrosine level via oxidation/reduction of band 3-associated phosphotyrosine phosphatase. *FEBS letters*;406:126-130.1997.