



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS E BIOLOGIA CELULAR

JESSICA SOUZA PINHEIRO

**A INDUÇÃO DO COMPORTAMENTO TIPO ANSIEDADE E  
ESTRESSE OXIDATIVO PELA INDOMETACINA NO  
CEREBRO DO *Danio rerio* (ZEBRAFISH) É PREVENIDA  
PELO  $\alpha$ -TOCOFEROL**

**BELÉM/PA**

**2021**

JESSICA SOUZA PINHEIRO

**A INDUÇÃO DO COMPORTAMENTO TIPO ANSIEDADE E  
ESTRESSE OXIDATIVO PELA INDOMETACINA NO  
CEREBRO DO *Danio rerio* (ZEBRAFISH) É PREVENIDA  
PELO  $\alpha$ -TOCOFEROL**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Neurociências e Biologia Celular da Universidade Federal do Pará como requisito final para obtenção do título de Mestre em Neurociências e Biologia Celular – Área de concentração em Neurociências.

**Orientador:** Prof. Dr. Anderson Manoel Herculano Oliveira da Silva

**Co-orientadora:** Prof (a) Dr (a) Karen Renata Herculano Matos Oliveira

**BELÉM/PA**

**2021**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD**

**Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Pará**

**Gerada automaticamente pelo módulo Ficat, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)**

---

P654i Pinheiro, Jessica Souza.

A indução do comportamento tipo ansiedade e estresse oxidativo pela indometacina no cérebro de Danio rerio (zebrafish) é prevenida pelo a-Tocoferol / Jessica Souza Pinheiro. — 2021.  
69 f. : il. color.

Orientador(a): Prof. Dr. Anderson Manoel Herculano Oliveirada  
Silva

Coorientação: Prof<sup>a</sup>. Dra. Karen Renata Herculano Matos  
Oliveira

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia celular, Belém, 2021.

1. AINES. 2. Indometacina. 3. Comportamento tipo ansiedade. 4. Estresse oxidativo. 5. Zebrafish. I. Título.

CDD 610

---

JESSICA SOUZA PINHEIRO

**A INDUÇÃO DO COMPORTAMENTO TIPO ANSIEDADE E  
ESTRESSE OXIDATIVO PELA INDOMETACINA NO  
CEREBRO DO *Danio rerio* (ZEBRAFISH) É PREVENIDA  
PELO  $\alpha$ -TOCOFEROL**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Neurociências e Biologia Celular da Universidade Federal do Pará como requisito final para obtenção do título de Mestre em Neurociências e Biologia Celular – Área de concentração em Neurociências.

**BANCA EXAMINADORA:**

---

Orientador: Prof. Dr. Anderson Manoel Herculano Oliveira da Silva – UFPA

---

Coorientador (a): Prof. Dra. Karen Renata Herculano Matos Oliveira – UFPA

---

Prof. Dra. Gilmara de Nazareth Tavares Bastos – UFPA (Avaliadora)

---

Prof. Dra. Luana Ketlen Reis Leão da Penha – UFPA (Avaliadora)

**BELÉM/PA**

**2021**

*Dedico este trabalho aos meus pais,  
Rosa Sousa e Eugênio Pinheiro, por todo o amor e suporte.  
E a mim, por não ter desistido e enfrentado todos os desafios para concluir este trabalho.*

## AGRADECIMENTOS

Durante essa jornada, que foi o meu mestrado, tenho muita gratidão por todas as pessoas que foram importantes de forma direta ou indireta para que eu conseguisse realizar meus objetivos científicos, mas antes de tudo quero começar agradecendo a Deus, que em todos os momentos difíceis e complicados se fez presente de alguma forma na minha vida, e me deu força e determinação para continuar.

Muitas coisas na minha vida foram fruto do trabalho árduo dos meus pais, Rosa Sousa e Eugênio Pinheiro, sem o amor incondicional e apoio deles em todos os seguimentos da minha vida eu não teria como alcançar meus sonhos e objetivos. Todo o amor e gratidão que eu sinto por vocês é difícil de expressar em poucas linhas, mas quero agradecer por cada lágrima enxugada, por cada abraço reconfortante, por cada sorriso tirado em momentos que tudo parecia desabar, vocês são meu suporte e saber que eu sempre posso contar com o amor e apoio de ambos, é o que motiva o meu crescimento pessoal e profissional. Agradeço também a minha irmã, Jamille Pinheiro, que foi a pessoa que me ouviu incansavelmente e me apoiou em todas as decisões, obrigada de verdade por cada momento, o amor que temos é incondicional.

Quero agradecer ao meu orientador, professor dr. Anderson Manoel Herculano, por ter me acolhido em seu laboratório e por todo apoio científico nesses últimos anos. Por vezes não consegui expressar a minha gratidão, admiração e respeito por esse grande cientista, mas quero deixar registrado o quanto eu sou grata pelo acolhimento, pelas críticas construtivas, que muitas vezes me fizeram refletir sobre o rumo da minha vida científica, e por ter acreditado no meu trabalho. Quero agradecer a todos professores do grupo LNE, em especial a professora Dr. Karen Renata, pelo apoio durante a minha seleção de mestrado e por todos os ensinamentos durante esse período.

Por muitas vezes pessoas maravilhosas me acolheram e ajudaram a enxergar de forma mais leve todos os problemas e desafios que apareceram durante essa jornada, por isso quero agradecer aos meus amigos de longa data Alexandre Bentaberry, Jardel Barbosa, Nágila Monteiro, Samanta Monteiro, Sayuri Ota, Evila Rodrigues, Mikelly Coutinho, Adria Azevedo, vocês de alguma forma me apoiaram (mesmo sem saber, por muitas vezes) e por isso foram, e são essenciais na minha vida.

Durante o período do mestrado fiz amigos que pretendo levar pra vida toda, e sou imensamente grata por todo o apoio e amor que recebi de todos, principalmente da minha grande amiga Nívia Franco Mendes, que esteve presente desde o meu primeiro dia de LNE, sempre me apoiando e incentivando, tenho muita sorte de poder contar com você. Quero continuar agradecendo a todo grupo LNE e amigos que fiz durante essa etapa da minha vida, sobretudo a Nadyme Assad (que foi meu suporte no laboratório em diversos momentos, seja de forma científica ou pessoal), Diego, Lucas, Brenda, Analú, Patrick e Gabriel. Vocês todos se tornaram essenciais na minha vida, e obrigada por todos os momentos de aprendizado, alegria e vitórias sejam elas pequenas ou grandes.

## RESUMO

Os anti-inflamatórios não-esteroidais estão entre as drogas mais utilizadas e prescritas no mundo, no entanto esse tipo de fármaco possui diversos efeitos colaterais a nível neural. Estudos relacionados a danos neurocomportamentais e neuroquímicos dessa classe de fármaco ainda são necessários para um melhor entendimento de todos os possíveis danos que eles podem ocasionar. Com isso, a indometacina, que é um AINE, vem sendo bastante utilizada para o tratamento de patologias como artrite reumatóides, lesões musculoesqueléticas, osteoartrite e dores pós-operatórias. A indometacina bloqueia de forma não seletiva as enzimas COX-1 e COX-2, atuando na diminuição da produção de prostaglandinas. Portanto, o objetivo do trabalho foi a avaliação dos efeitos ansiogênicos gerados pela indometacina e o estresse oxidativo no cérebro, e se o antioxidante  $\alpha$ -tocoferol exercia proteção diante dos possíveis danos gerados pela indometacina em *Danio rerio* (zebrafish). Os animais utilizados foram peixes da espécie *Danio rerio* (n=160), que foram subdivididos em: Controle – Salina 0,9%; Indometacina - INDO 0,5 mg/kg; INDO 0,75 mg/kg; INDO 1,0 mg/kg; INDO 2,0 mg/kg; INDO 3,0 mg/kg;  $\alpha$ -Tocoferol – TF; TF+ INDO 1 mg/kg; TF+ INDO 2 mg/kg e foram submetidos ao teste de distribuição vertical eliciado pela novidade, onde os parâmetros tempo no topo, congelamento, nado errático e quadrantes cruzados foram analisados. A análise estatística dos resultados foi realizada através de ANOVA de uma via com pós-teste *bonferroni* ou *tukey* para comparação entre os grupos, sendo considerado significativo valores com  $p < 0,05$ . Os resultados referentes aos parâmetros comportamentais e de estresse oxidativo foram expressos em média  $\pm$  erro padrão ou desvio padrão. Os parâmetros que apresentaram diferenças estatísticas foram os de tempo no topo e congelamento, onde os animais dos grupos INDO 0,5 mg/kg, INDO 0,75 mg/kg, INDO 1 mg/kg e INDO 2 mg/kg exploraram por menos tempo o topo do aparato em comparação ao grupo CTRL. No parâmetro de congelamento os grupos tratados com indometacina INDO 0,5 mg/kg, 0,75 mg/kg e 2 mg/kg não demonstraram possuir diferenças estatísticas com o grupo CTRL, no entanto se observou uma diferença entre os grupos CTRL e INDO 1 mg/kg. No parâmetro de congelamento os animais do grupo INDO 1 mg/kg apresentaram um maior tempo sem movimentação em comparação ao grupo CTRL. Nos demais parâmetros não houveram diferenças significativas dos grupos tratados com o grupo controle. Quanto a análise da peroxidação lipídica, os grupos INDO 1 mg/kg e INDO 2 mg/kg apresentaram um aumento da produção de MDA em comparação ao grupo CTRL, inferindo assim que houve um aumento do estresse oxidativo quando os animais eram tratados com indometacina. E o  $\alpha$ -tocoferol exerceu uma proteção quando os animais foram tratados previamente tanto no grupo TF+ INDO 1 mg/kg, quanto no grupo TF+ INDO 2 mg/kg em comparação com os grupos INDO 1 mg/kg e INDO 2 mg/kg, respectivamente. Por tanto a indometacina está envolvida na indução do comportamento tipo ansiedade e no estresse oxidativo em cérebros de *zebrafish*.

**Palavras-chave:** AINES, indometacina, comportamento tipo ansiedade, estresse oxidativo, zebrafish.

## ABSTRACT

The non-steroidal anti-inflammatory drugs are among the most used and prescribed in the world, however this type of drug has several side effects at the neural level. Studies related to neurobehavioral and neurochemical damage of this class of drug are still necessary for a better understanding of all the possible damages that they can cause. As a result, indomethacin, which is an NSAID, has been widely used to treat pathologies such as rheumatoid arthritis, musculoskeletal injuries, osteoarthritis and postoperative pain. Indomethacin non-selectively blocks the enzymes COX-1 and COX-2, acting to decrease the production of prostaglandins. Therefore, this study proposed that the indomethacin could be generated anxiogenic effects and oxidative stress in the brain, and whether the antioxidant  $\alpha$ -tocopherol exercised protection against the possible damage caused by indomethacin in zebrafish. The animals used were fish of the species *Danio rerio* (n=160), subdivided into the following groups: Control - Saline 0.9%; Indomethacin - INDO 0.5 mg/kg; INDO 0.75 mg/kg; INDO 1.0 mg/kg; INDO 2.0 mg/kg; INDO 3.0 mg/kg;  $\alpha$ -Tocopherol - TF; TF + INDO 1 mg/kg; TF + INDO 2 mg/kg and were subjected novel tank diving test, the parameters time on top, freezing, erratic swimming and crossed quadrants were analyzed. The statistical analysis of the results was performed using one-way ANOVA with a post-test bonferroni or tukey for comparison between groups, with values with  $p < 0.05$  being considered significant. The results regarding the behavioral parameters and oxidative stress were expressed as mean  $\pm$  standard error or standard deviation. The parameters that showed statistical differences were the time at the top and freezing, where the animals of the groups INDO 0.5 mg/kg, INDO 0.75 mg/kg, INDO 1 mg/kg and INDO 2 mg/kg explored for less the top of the apparatus compared to the CTRL group. In the freezing parameter the groups treated with indomethacin INDO 0.5 mg/kg, 0.75 mg/kg and 2 mg/kg did not show statistical differences with the CTRL group, however there was a difference between the CTRL and INDO groups 1 mg/kg. In the freezing parameter, the animals in the INDO 1 mg/kg group showed a longer time without movement compared to the CTRL group. In the other parameters, there were no significant differences between the groups treated with the control group. The analysis of lipid peroxidation, the INDO 1 mg/kg and INDO 2 mg/kg groups showed an increase in MDA production compared to the CTRL group, thus inferring that there was an increase in oxidative stress when animals were treated with indomethacin. The  $\alpha$ -tocopherol exercised protection when animals were previously treated in both the TF + INDO 1 mg/kg group and the TF + INDO 2 mg/kg group compared to the INDO 1 mg/kg and INDO 2 mg/kg groups, respectively. Therefore, indomethacin is involved in inducing anxiety-like behavior and oxidative stress in zebrafish brains.

**Keywords:** NSAIDs, indomethacin, anxiety-like behavior, oxidative stress, zebrafish.

## LISTA DE FÍGURAS E TABELAS

**Tabela 1:** Relação de anti-inflamatórios não-esteroidais e seus efeitos farmacológicos

**Tabela 2:** Tabela de sobrevivência dos animais nos grupos experimentais em função do tempo após exposição á indometacina.

**Figura 1:** Mecanismo de ação das enzimas ciclo-oxigenases COX-1, COX-2 e COX-3 e a inibição pela administração de AINES.

**Figura 2:** Estrutura química da indometacina.

**Figura 3:** *Danio rerio* (zebrafish), variedade longfin.

**Figura 4:** Representação dos grupos experimentais de acordo com o tratamento administra

**Figura 5:** Representação esquemática da linha temporal do experimento realizado através do teste de distribuição vertical eliciado pela novidade.

**Figura 6:** Efeito da indometacina no parâmetro comportamental tempo no topo através do teste de distribuição vertical eliciado pela novidade em *Danio rerio*.

**Figura 7:** Efeito da indometacina no parâmetro comportamental de congelamento através do teste de distribuição vertical eliciado pela novidade em *Danio rerio*.

**Figura 8:** Efeito da indometacina no parâmetro comportamental nado errático através do teste de distribuição vertical eliciado pela novidade em *Danio rerio*.

**Figura 9:** Efeito da indometacina no parâmetro comportamental quadrantes cruzados através do teste de distribuição vertical eliciado pela novidade em *Danio rerio*.

**Figura 10:** Efeito da indometacina após o tratamento com  $\alpha$ -tocoferol no parâmetro comportamental tempo no topo através do teste de distribuição vertical eliciado pela novidade em *Danio rerio*.

**Figura 11:** Efeito da indometacina após o tratamento com  $\alpha$ -tocoferol no parâmetro comportamental de congelamento através do teste de distribuição vertical eliciado pela novidade em *Danio rerio*.

**Figura 12:** Efeito da indometacina após o tratamento com  $\alpha$ -tocoferol no parâmetro comportamental nado errático através do teste de distribuição vertical eliciado pela novidade em *Danio rerio*.

**Figura 13:** Efeito da indometacina após o tratamento com  $\alpha$ -tocoferol no parâmetro comportamental quadrantes cruzados através do teste de distribuição vertical eliciado pela novidade em *Danio rerio*.

**Figura 14:** Efeito da indometacina antes e após o pré-tratamento com  $\alpha$ -tocoferol no ensaio de peroxidação lipídica, onde os níveis de MDA foram dosados nos cérebros de *zebrafish*.

**Figura 15:** Esquema representativo do efeito da indometacina e do pré-tratamento com  $\alpha$ -tocoferol no cérebro de *zebrafish*.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>AA</b>	Ácido araquidônico
<b>AINES</b>	Anti-inflamatórios não-esteroides
<b>ANOVA</b>	Análise de variância
<b>ATP</b>	Adenosina trifosfato
<b>CAT</b>	Enzima catalase
<b>COX</b>	Ciclo-oxigenase
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>DVN</b>	Distribuição vertical eliciada pela novidade
<b>ERN</b>	Espécie reativa do nitrogênio
<b>ERO</b>	Espécie reativa do oxigênio
<b>GPx</b>	Enzima glutationa peroxidase
<b>GTPase</b>	Enzimas hidrolases que hidrolisam o GTP
<b>i.p.</b>	Injeção intraperitoneal
<b>IL</b>	Interleucina
<b>INDO</b>	Indometacina
<b>MDA</b>	Malondialdeído
<b>NADPH</b>	Fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida adenina
<b>NF-k<math>\beta</math></b>	Fator nuclear kappa $\beta$
<b>NMFI</b>	N-metil-2-fenilindol
<b>OMS</b>	Organização Mundial da Saúde
<b>PGE<sub>2</sub></b>	Prostaglandina E <sub>2</sub>
<b>PGL<sub>2</sub></b>	Prostaglandina prostaciclina
<b>PG</b>	Prostaglandina
<b>PLA<sub>2</sub></b>	Fosfolipase A <sub>2</sub>
<b>SNC</b>	Sistema nervoso central
<b>SOD</b>	Enzima Superóxido dismutase
<b>TF</b>	Tocoferol
<b>TGI</b>	Trato gastrointestinal
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Fator de necrose tumoral $\alpha$

**TXA<sub>2</sub>**

Tromboxano A<sub>2</sub>

**α-TAP**

Proteína associada ao α- tocoferol

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>15</b>
1.1. CONSIDERAÇÕES GERAIS .....	15
1.2. RELAÇÃO DO TRANTORNO DE ANSIEDADE COM AINES .....	17
1.3. INDOMETACINA .....	19
<b>1.3.1. Mecanismo de ação da indometacina</b> .....	<b>20</b>
1.4. ESTRESSE OXIDATIVO .....	22
1.5. ANSIEDADE E ESTRESSE OXIDATIVO.....	24
<b>1.5.1. Efeito do antioxidante <math>\alpha</math>-tocoferol</b> .....	<b>25</b>
1.6. ZEBRAFISH COMO MODELO EXPERIMENTAL DO COMPORTAMENTO TIPO ANSIEDADE.....	27
<b>1.6.1. Teste de distribuição vertical eliciada pela novidade para avaliação do comportamento tipo ansiedade</b> .....	<b>29</b>
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>31</b>
2.1. OBJETIVO GERAL .....	31
2.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS .....	31
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>32</b>
3.1. ANIMAIS E ALOJAMENTO .....	32
3.2. DROGAS E REAGENTES .....	32
3.3. GRUPOS EXPERIMENTAIS .....	33
3.4. DISTRIBUIÇÃO VERTICAL ELICIADA PELA NOVIDADE .....	34
<b>3.4.1. Ensaio de Peroxidação Lipídica</b> .....	<b>35</b>
<b>3.4.2. Quantificação de proteínas</b> .....	<b>36</b>
3.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	36
<b>4. RESULTADOS</b> .....	<b>37</b>

4.1. A INDOMETACINA INDUZ O COMPORTAMENTO TIPO ANSIEDADE NO TESTE DE DISTRIBUIÇÃO VERTICAL ELICIADA PELA NOVIDADE EM <i>Danio rerio</i> .....	37
4.2. O COMPORTAMENTO TIPO ANSIEDADE INDUZIDO PELA INDOMETACINA É PREVINIDO PELO ANTIOXIDANTE $\alpha$ -TOCOFEROL NO TESTE DE DISTRIBUIÇÃO VERTICAL ELICIADA PELA NOVIDADE EM <i>Danio rerio</i> . ....	41
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>46</b>
<b>6. CONCLUSÃO .....</b>	<b>54</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS.....</b>	<b>56</b>
<b>8. ANEXOS .....</b>	<b>66</b>

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. CONSIDERAÇÕES GERAIS

O uso indiscriminado de anti-inflamatórios não esteroidais (AINES) vem aumentando de forma exponencial nos últimos anos, isso se deve a facilidade com que esses medicamentos são adquiridos, como também por serem a classe de medicamentos mais prescritas em todo o mundo. Os AINES em sua maioria possuem ação analgésica e antipirética, sendo utilizados principalmente no tratamento de doenças como osteoartrites, artrite reumatoide e distúrbios musculoesqueléticos (BATLOUNI, 2010; KOROLKOVAS, 2014; BRENOL et al., 2000). Há uma ampla gama de medicamentos AINES no mercado atualmente, alguns exemplos estão demonstrados na **tabela 1**, bem como suas propriedades farmacológicas. Dentre os AINES comumente mais prescritos, destaca-se a indometacina, este fármaco possui ação analgésica e antipirética, sua via de ação é através do bloqueio não seletivo da COX, levando a um bloqueio da biossíntese de prostaglandinas que contribuem em diversas funções fisiológicas e patofisiológicas, como demonstrado na **figura 1**, (BATLOUNI, 2010; FITZPATRICK, 2004).

A COX é responsável pela síntese das prostaglandinas, esta enzima é responsável pela conversão do ácido araquidônico (AA) em intermediários lipídicos, levando à formação de prostaglandinas (PGs) e tromboxano (TxA<sub>2</sub>). Esta enzima possui três isoformas, a COX-1 (constitutiva ou fisiológica), a COX-2 (induzida ou inflamatória), e a COX-3, que é uma variação da COX-1 (FITZGERALD; PATRONO, 2001). A COX-1 é uma enzima expressa na maioria dos tecidos, sendo caracterizada como constitutiva, está envolvida no processo de homeostase de diversos sistemas, como a proteção de mucosas intestinais, controle do fluxo sanguíneo renal, homeostasia, respostas autoimunes, funções do sistema nervoso central, cardiovasculares e reprodutivas (CHEN et al., 2001; BATLOUINI, 2010). A COX-2 é uma enzima expressa de forma intensificada quando há um processo inflamatório, contribuindo para o reparo da lesão, como também para o desenvolvimento da lesão crônica. É caracterizada como induzível, sendo expressa na maioria dos tecidos durante uma resposta inflamatória, e de forma constitutiva em neurônios e rim (OLIVEIRA, 2007; CHAHADE; GIORGI; SZAJUBOK, 2008; XU et al., 2009). Diversas pesquisas já elucidaram o papel da COX-2 durante processos inflamatórios, como na progressão tumoral. Jean-Claude e colaboradores (2007), demonstram

que na presença de glioma houve um aumento da expressão de COX-2 tanto em células tumorais, quanto nos vasos que nutrem o tumor. Outra isoforma da ciclo-oxigenase, é a COX-3, que é uma variante do gene que expressa a COX-1, sendo expressa principalmente no coração e em altos níveis no sistema nervoso central (**figura 1**). Alguns fármacos analgésicos e antipiréticos estão envolvidos na inibição dessa enzima, a exemplo do paracetamol. No entanto ainda há algumas controvérsias sobre a real origem e atividade da COX-3 (CHAHADE; GIORGI; SZAJUBOK, 2008).

Os AINES possuem diversos efeitos adversos como gastrite, úlceras gástricas, perfuração gastrointestinal, disfunção plaquetária, hemorragia e comprometimento renal (LAINE et al., 2012). Alguns estudos associam a utilização desses fármacos a um maior risco de infarto agudo do miocárdio, acidente vascular cerebral, insuficiência cardíaca, insuficiência renal e hipertensão arterial (BATLOUNI et al., 2010). No sistema nervoso central (SNC), os AINES estão associados a Meningite asséptica, psicose e disfunção cognitiva (CHAHADE; GIORGI; SZAJUBOK, 2008). Segundo os estudos de Dhikary e colaboradores (2011), os AINES podem estar envolvidos a distúrbios neurocomportamentais, como a ansiedade, devido ao aumento de espécies reativas do oxigênio assim como o bloqueio da produção de prostaglandinas, no entanto essa possível relação dessa classe de medicamentos com a ansiedade ainda necessita de mais estudos.

**Tabela 1:** Relação de anti-inflamatórios não-esteroidais e seus efeitos farmacológicos

<b>Anti-inflamatórios não-esteroidais (AINES)</b>	<b>Efeitos farmacológicos</b>
<b>Ácido acetilsalicílico (AAS)</b>	Alivia dor de baixa intensidade; efetivo antipirético; e apresenta efeito sobre o trato gastrointestinal (TGI)
<b>Indometacina (Indocid)</b>	Potência moderada, superior ao AAS, bem como os efeitos no TGI; potente efeito analgésico; antipirético; e moderada ação anti-inflamatória.
<b>Piroxicam (Faldene)</b>	Atividade anti-inflamatória; analgésica; e antipirética.
<b>Celecoxib</b>	Atividade anti-inflamatória; apresenta menores índices de reação sobre o TGI e maior risco cardiovascular.
<b>Naproxeno (Naprosin)</b>	Potente ação anti-inflamatória; efeito antipirético; efeito analgésico; e apresenta intenso efeito sobre o TGI.
<b>Ibuprofeno (Dalsy, Motrin)</b>	Ação anti-inflamatória; e um potente agente antipirético.
<b>Ácido mefenâmico</b>	Ação central e periférica; efeitos sobre o TGI; antagoniza diretamente alguns efeitos das PGs; ação anti-inflamatória.

Fonte: adaptado Goodman & Gilman's (2005).

## 1.2. RELAÇÃO DO TRANSTORNO DE ANSIEDADE COM AINES

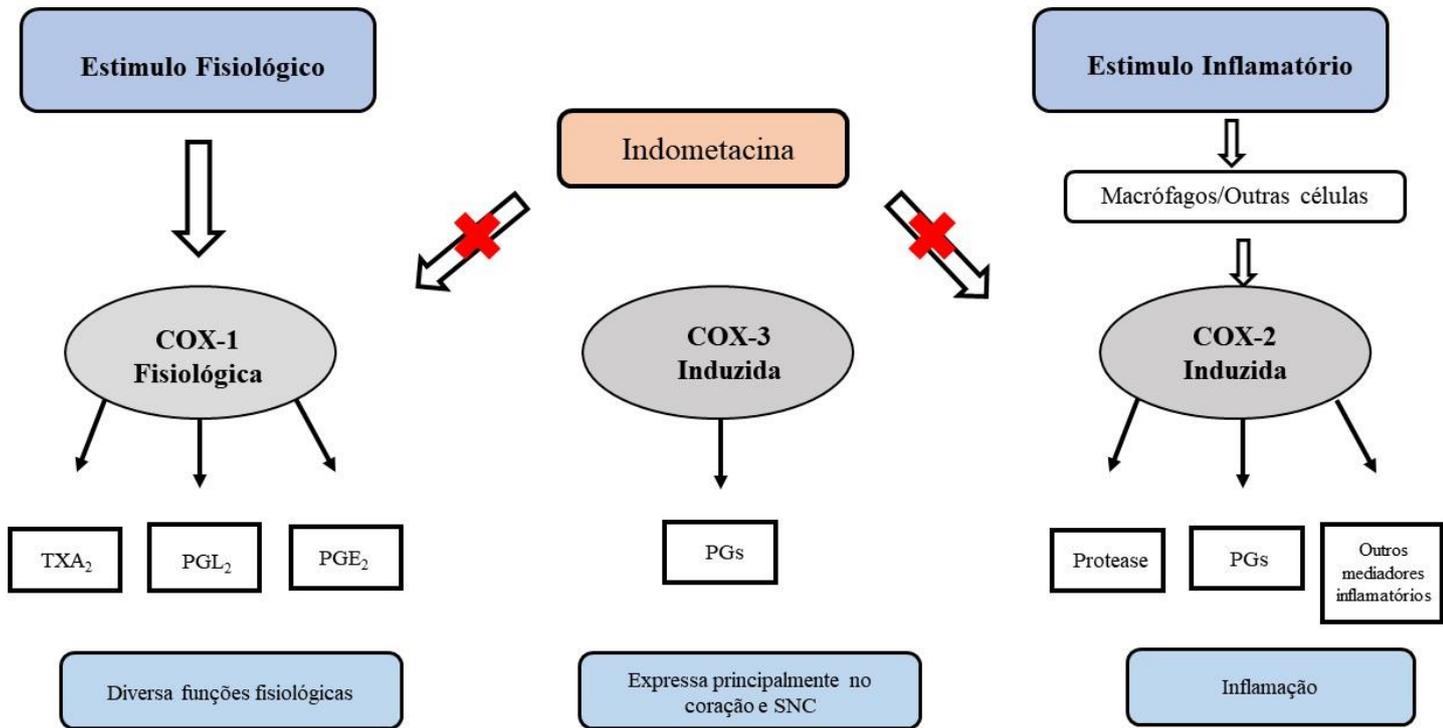
Dentre os transtornos neurocomportamentais, o transtorno de ansiedade é o mais prevalente em diversos países, constituindo o maior grupo de transtornos mentais (KESSLER et al, 2004; BAXTER et al, 2012; HARO et al,2014). A ansiedade é descrita como um comportamento que avalia situações de riscos, sendo um estado de antecipação sobre ameaças futuras percebidas (CRASKE et al., 2009). É interessante ressaltar, que em modelos de mamíferos, a ansiedade se diferencia do medo em relação a proximidade e certeza do estímulo aversivo, pois o medo ocorre como resultado da percepção da ameaça iminente, incitando a diversas estratégias defensivas na presença real do risco, como respostas de luta/fuga

(GRAEFF, 2007), enquanto a ansiedade é um estado de antecipação a situações aversivas que podem ou não ocorrer (GOULD & GOTTESMAN, 2006; KALLUEF et al., 2007).

Quando as manifestações da ansiedade se tornam um comportamento frequente, ocorre o desenvolvimento do transtorno de ansiedade, segundo a Organização Mundial da Saúde 3,6% da população mundial possui este transtorno (OMS, 2017). Essa desordem pode ser justificada pelo estilo de vida adotado nas grandes metrópoles, que exige um estado de alerta iminente e uma profunda mudança no sistema de vigília/sono, como também a indução desse comportamento pode ocorrer através de indução medicamentosa.

Segundo GRAEFF (1999), a ansiedade é um comportamento de caráter adaptativo inerente a maioria das espécies, podendo ser descrita como um estado emocional subjetivo de alerta frente a situações potencialmente aversivas, o qual é marcado por alterações cognitivas, fisiológicas e comportamentais. O uso de AINES podem levar a todas essas alterações envolvidas no desenvolvimento do transtorno de ansiedade, devido a produção de úlceras gástricas que através de múltiplos mecanismos, incluindo a geração de espécies reativas de oxigênio, o início da peroxidação lipídica, a supressão da síntese de prostaglandinas e o desequilíbrio dos mediadores pró-inflamatórios, levam a inflamação crônica gastrointestinal induzindo um comportamento semelhante a ansiedade como também a alterações bioquímicas do sistema nervoso central (ADHIKARY et al., 2011; BERCIK et al., 2010), assim estabelecendo uma possível relação do usos de AINES e ansiedade.

O uso prolongado do AINE, indometacina, está associado a diversos efeitos adversos, pois através da inativação da COX-1, esse fármaco bloqueia a produção de prostaglandinas envolvidas na proteção gástrica e também pode levar a eventos de riscos cardiovasculares, além de aumentar os riscos de toxicidade renal e acidente vascular cerebral (GRIFFIN et al., 2000; MENDES et al., 2012). Estudos demonstraram que a indometacina está envolvida em danos no sistema gástrico e hepático. Além de danos no sistema gastrointestinal, a indometacina também está envolvida na geração de danos no sistema nervoso central como disfunção cognitiva e psicose (CHAHADE; GIORGI; SZAJUBOK, 2008).

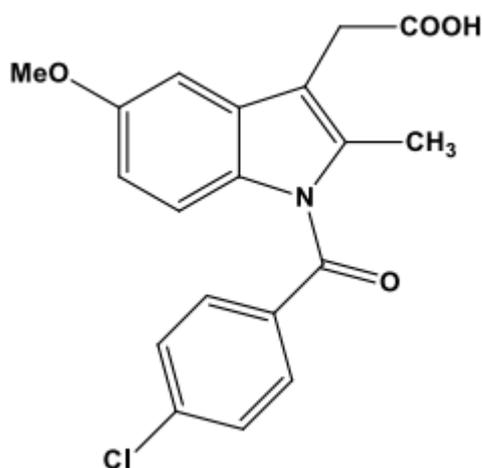


**Figura 1:** Mecanismo de ação das enzimas ciclo-oxigenases COX-1, COX-2 e COX-3 e a inibição pela administração da indometacina (Adaptado: CARVALHO; LEMÔNICA, 1998).

### 1.3. INDOMETACINA

Como a maioria dos AINEs, a indometacina possui uma ação anti-inflamatória, analgésica e antipirética, sendo amplamente utilizado para tratamento de artrite reumatóides, lesões muscoesqueléticas, osteoartrite e dores pós-operatórias. Esse medicamento foi descoberto em 1963, sendo um dos anti-inflamatório não esteroidais mais antigos, surgindo para substituir o fármaco fenilbutazona que já estava sendo utilizado como anti-inflamatório, no entanto possuía efeito danoso ao gerar o aparecimento de casos de agranulocitose (MONTEIRO et al., 2008), revelando assim a necessidade de introdução de um novo fármaco AINE no mercado.

A indometacina é um derivado do ácido indolacético (Ácido 2-{1-[(4-clorofenil)carbonil]-5-metoxi-2-metil-1H-indol-3-il}acético) (**figura 2**), e a dose terapêutica comumente usada oralmente deste medicamento está entre 25 mg a 50 mg, essa dose corresponde a 10 mg/kg em modelo animais utilizando camundongos, possuindo um intervalo de 4-8 horas, sendo a dose máxima de administração dessa droga 200 mg por dia (WANNAMACHER; FERREIRA, 2004). A indometacina possui uma rápida absorção, com o pico de concentração plasmática de 1-2 horas após administração.



**Figura 2:** Estrutura química da indometacina

### 1.3.1. Mecanismo de ação da indometacina

Semelhante ao mecanismo de ação de outros AINES, a ação farmacológica da indometacina ocorre através do bloqueio de produção de prostaglandinas, e isso leva tanto ao seu perfil terapêutico quanto aos seus efeitos adversos, pois como a indometacina é um AINE não seletivo, ela atua no bloqueio tanto da COX-1 como a COX-2, modulando assim tanto processos homeostáticos como inflamatórios.

Ao bloquear a COX-1, que é considerada uma enzima constitutiva, a indometacina inativa a produção de várias prostaglandinas como a TXA<sub>2</sub>, PGL<sub>2</sub> e PGE<sub>2</sub> envolvidas na homeostase de diversos tecidos e órgãos, como a proteção da mucosa gástrica, como demonstrado na **figura 1**, portanto essa modulação da COX-1 está relacionada principalmente com a indução de vários efeitos adversos. Já os efeitos modulatórios da indometacina no processo inflamatório se dá através do bloqueio da COX-2, onde esse bloqueio inativa a produção de prostaglandinas que estão envolvidas no processo inflamatório, logo ocasionando uma diminuição na produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 (DANNHARDT; KIEFER, 2001).

Assim como outros fármacos AINES, a indometacina atravessa a barreira hematoencefálica, chegando de forma rápida ao SNC após sua administração. Pesquisas relacionadas ao papel da indometacina na proteção e no combate a doenças neurodegenerativas vem sendo realizados ao longo dos anos, principalmente em doenças como o Alzheimer e Parkinson (PAREPALLY et al., 2006).

Nold e colaboradores (2007), realizaram estudos para observar os efeitos adversos da indometacina durante uma ingestão crônica, e conseguiram demonstrar que algumas complicações graves podem ocorrer como, a síndrome de má absorção, perfuração e hemorragia intestinal, que podem levar a um choque séptico. Além disso a indometacina bloqueia a produção de algumas prostaglandinas envolvidas na homeostase do sistema gastrointestinal, na modulação da dilatação vascular renal e sistêmica, da filtração glomerular, secreção tubular de sódio e água, da transmissão adrenérgica (HAWKEY; SKELLY, 2002; REED, 2002; FILARETOVA et al., 2007).

Além de afetar a homeostase do sistema gastrointestinal ao bloquear a produção de algumas prostaglandinas, a indometacina também está envolvida no aumento de da peroxidação lipídica através do dano hepático como demonstrado por LV e colaboradores (2006), devido a supressão da sinalização do NF- $\kappa$ B, levando assim a um quadro de estresse oxidativo. Segundo Naito e colaboradores (1998), a indometacina aumenta a produção de espécies reativas do oxigênio através de lesões gastrintestinais. E esse aumento de ERO gerado pela indometacina está envolvido no comprometimento estrutural e funcional das mitocôndrias levando assim a um estresse mitocondrial (STEINMEYER, 2000; SOMASUNDARAM, et al., 1997).

Nesse contexto, é interessante ressaltar que os efeitos gerados pela indometacina através do bloqueio não seletivo da COX, como também a geração de danos ao DNA, e aumento do estresse oxidativo no SNC (BASIVIREDDY et al., 2003), podem estar gerando danos neurais, que podem levar a transtornos neurocomportamentais. Muitas doenças do SNC estão associadas aos danos gerados por estresse oxidativo (PATEL, 2016). Dentre as doenças neuropsiquiátricas, a ansiedade vem sendo amplamente associadas à produção excessiva de radicais livres, embora essa associação ainda não seja totalmente esclarecida. Portanto, como os AINES, aumentam os níveis de estresse oxidativo em diversos sistemas, a indometacina pode ter alguma relação com a ansiedade, no entanto esse fenômeno ainda necessita de mais estudos.

#### 1.4. ESTRESSE OXIDATIVO

A produção de espécies reativas do oxigênio (ERO) e nitrogênio (ERN) ocorre de forma contínua e fisiológica, e são responsáveis por modular diversas funções biológicas. As espécies reativas participam dos processos metabólicos atuando como mediadores através da doação de elétrons a diversas moléculas durante as reações bioquímicas que ocorrem no organismo de forma natural. Essas moléculas geram adenosina trifosfato (ATP), quando são produzidas de em quantidades adequadas, através do transporte de elétrons, além de estarem envolvidas na ativação de genes e participarem de mecanismos de defesa durante processos inflamatórios (FERREIRA & MATSUBARA, 1997; NYSKA & KOHEN, 2002).

Quando a produção de espécies reativas é produzida de forma intensa pode induzir a diversos danos celulares (SHAMI & MOREIRA, 2004). À medida que a produção de espécies reativas se torna constante durante reações bioquímicas mecanismos de defesa para reparar esse excesso da produção dessas espécies ocorrem, como o mecanismo de defesa antioxidante, que consiste em limitar os níveis celulares dessas espécies, de forma a controlar o efeito nocivo dessas moléculas em diversos processos celulares (BIANCHI & ANTUNES, 1999; SHAMI & MOREIRA, 2004).

Contudo, a indução do estresse oxidativo é ocasionado quando há um desbalanço entre compostos oxidantes e antioxidantes, e os radicais livres ou espécies reativas são produzidas de forma excessiva ou a capacidade antioxidante das moléculas é diminuída prejudicando a

remoção dessas moléculas. Com o aumento de espécies reativas é que ocorre o processo oxidativo de biomoléculas levando assim a ineficiência de diversas funções celulares e/ou ao desequilíbrio homeostático. Durante a progressão de algumas patologias como desordens neurodegenerativas, doenças inflamatórias, doenças cardiovasculares e desordens metabólicas vários mediadores inflamatórios e citocinas são produzidas de forma intensa por macrófagos, neutrófilos e linfócitos (GIASSON et al., 2000), e todo esse processo leva a um aumento do estresse oxidativo, gerando assim disfunções teciduais, danos no DNA e proteínas (SCHIEBER, 2014).

Estudos relacionando o estresse oxidativo á danos no SNC já foram descritos, em decorrência do cérebro apresentar uma maior sensibilidade a danos gerados pelo estresse oxidativo, esses danos incluem uma alta taxa de consumo de oxigênio no seu metabolismo, levando assim um aumento da geração de radicais livres, além de possuir uma defesa antioxidante pouco desenvolvida, associado a isso, o cérebro possui uma constituição rica em lipídeos que podem ser oxidados de forma rápida, e alguns neurotransmissores possuem um expressivo potencial redutor e a presença de metais redox que participam de processos catalíticos (HALLIWELL, 2006; VALKO et al., 2007). Embora a relação estresse oxidativo e ansiedade ainda não esteja totalmente elucidada, Kuloglu e colaboradores (2002), demonstraram uma relação entre estresse oxidativo e algumas desordens de ansiedade, como transtorno obsessivo compulsivo e desordens de pânico, inferindo assim que o metabolismo oxidativo pode afetar a regulação da ansiedade.

Com isso, alguns estudos relacionam o aumento do estresse oxidativo com a ansiedade, isso deve-se ao fato que mecanismos oxidativos podem ser fatores patogênicos comum em diversas desordens neurológicas (WU; LIU; NG, 2008). A administração de substâncias antioxidantes pode induzir comportamentos ansiogênicos, segundo Bouayed (2018), a administração sistêmica de peróxido de hidrogênio (PH) induziu comportamentos semelhantes a ansiedade em roedores. Em contrapartida, a administração de agentes antioxidantes demonstrou capacidade de proteção a alterações comportamentais em diversos modelos de ansiedade experimental, sugerindo assim que o estresse oxidativo pode estar envolvido na gênese desse comportamento (DE CARVALHO et al., 2019; PALLOMA DE ALMEIDA SOARES HOCAYEN, 2017).

## 1.5. ANSIEDADE E ESTRESSE OXIDATIVO

O cérebro humano consome aproximadamente 20% do oxigênio basal durante diversos processos metabólicos, havendo necessidade de utilização de oxigênio que conseqüentemente gera um aumento da produção de radicais livres em várias regiões do cérebro, com isso o SNC é extremamente susceptível aos danos ocasionados pelo estresse oxidativo (HALLIWELL, 2006; VALKO et al., 2007).

Danos ocasionados por estresse oxidativo no cérebro levam a lesões secundárias, através de efeitos neurotóxicos causados por amina excitatória, como é o caso do glutamato, e ativação da resposta inflamatória (HALLIWELL, 2006). Alguns estudos sobre o envolvimento do estresse oxidativo no SNC e a indução da ansiedade já foram realizados, demonstrando que há uma relação quando há um aumento da produção de radicais livres nesse sistema. (BEHL et al., 2010; BULUT et al., 2013; CHAKRABORTY et al., 2009; EMHAN et al., 2015; ERSAN et al., 2006; HASSAN et al., 2014; KANDEMIR et al., 2013; KAYA et al., 2013; KROLOW et al., 2014; KULOGLU et al., 2002a, 2002b; NG et al., 2008). No entanto esses estudos são relativamente recentes, necessitando de mais pesquisas tanto em animais quanto em humanos, que validem todas as hipóteses sugeridas.

Segundo Bouayed e colaboradores (2009), o comportamento tipo ansiedade está relacionada ao aumento de marcadores de estresse oxidativo periférico no SNC. Ao utilizar a vitamina A como indutor ansiogênico, houve um aumento do estresse oxidativo no hipocampo de ratos, conseqüentemente houve um aumento de marcadores envolvidos em processos oxidativos como a peroxidação lipídica, oxidação de algumas proteínas, carbonilação proteica e alteração nos níveis de enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) (DE OLIVEIRA et al., 2007).

Outro estudo relevante descrito por Salim e colaboradores (2010), mostraram que após a indução do estresse crônico por contenção em camundongos, houve um aumento do comportamento tipo ansiedade, assim como o aumento do estresse oxidativo, demonstrando assim que há uma relação entre o comportamento tipo ansiedade com o estresse oxidativo. Translocando essas pesquisas, em humanos foi observado uma elevação da peroxidação lipídica e alterações da produção de moléculas antioxidantes quando comportamentos

ansiógênicos eram induzidos (BULUT et al., 2013; EMHAN et al., 2015; KAYA et al., 2013). No entanto ainda se faz necessário um melhor entendimento sobre como a desregulação redox afeta diversas áreas do SNC podendo induzir a danos de caráter oxidativos provendo assim neuropatologias ou contribuindo para a intensidade de danos celulares.

Portanto, para reparar os efeitos danosos gerados pelo o aumentos de espécies reativas no cérebro, estudos *in vitro* já demonstraram que o tratamento com antioxidantes possui efeitos no mecanismo de reparo do DNA, diminuem o processo de peroxidação lipídica, além de modularem várias vias bioquímicas envolvidas na produção de espécies reativas (YANG et al., 2018). Além disso, alguns estudos com modelos animais já demonstraram que alterações no equilíbrio redox induzem ao comportamento ansiógênico, considerando assim que mecanismos envolvidos na indução do estresse oxidativo esteja relacionado a transtornos psiquiátricos e o uso de fármacos com propriedades antioxidantes podem ser considerados alvos terapêuticos de grande interesse (NG et al., 2008).

Com isso, alguns resultados do antioxidante  $\alpha$ -Tocoferol em alterações bioquímicas, que levam a diversas neuropatologias como depressão e transtorno de ansiedade, se mostraram satisfatórios na redução da produção de espécies reativas, além do que esse antioxidante possui propriedades lipofílicas, podendo neutralizar reações que levam ao aumento do estresse oxidativo de forma intracelular.

### **1.5.1. Efeito do antioxidante $\alpha$ -tocoferol**

O  $\alpha$ -tocoferol é um composto antioxidante, sendo a forma mais abundante encontrada entre os compostos de vitamina E, possuindo um potente efeito na redução do estresse oxidativo. Alguns estudos associam o baixo consumo desse antioxidante ao aumento do risco de câncer, doenças cardiovasculares e neurodegenerativas (YANG et al., 2019). Esse composto é altamente oxidável em presença de luz e ar, por isso deve ser manipulado de forma adequada.

Os compostos da família de vitamina E apresentam uma intensa atividade antioxidante, principalmente quando estão *in natura* e são muito utilizados na formulação de vários produtos da indústria farmacêutica e alimentícia (FRANCO, 2008). Embora o  $\alpha$ -tocoferol seja

encontrado em algumas fontes animais, os compostos que abrangem a vitamina E possuem sua síntese em vegetais, sendo encontrados principalmente em algumas sementes, como as de girassóis (GRILLO et al., 2014).

Por ser uma molécula lipossolúvel, o  $\alpha$ -tocoferol é facilmente absorvido por ácidos biliares e enzimas pancreáticas sendo absorvidos pelos enterócitos, sendo então incorporados em quilomícrons (EGGERMONT, 2006; SCHNEIDER, 2005). E através da enzima lipase lipoproteica os quilomícrons são hidrolisados, sendo então incorporados aos tecidos extra-hepáticos, liberando o  $\alpha$ -tocoferol. Contudo, as moléculas que restam nos quilomícrons remanescentes são transportadas para o fígado, onde são endocitados pelas células hepáticas (GALLAGHER, 2013; YEUNG; LAQUATRA, 2003; HACQUEBARD; CARPENTIER, 2005; TRABER, 2012; COOPER, 1997).

No fígado, através da ação da proteína de transferência de  $\alpha$ -tocoferol ( $\alpha$ -TPP), o  $\alpha$ -tocoferol é transferido ao retículo endoplasmático para ser incorporado a lipoproteínas de baixa densidade para ser secretado na corrente sanguínea (ROSS et al, 2014). Na circulação o  $\alpha$ -tocoferol é distribuído para os tecidos através de lipoproteínas de alta e baixa densidade (HERRERA; BARBAS, 2001; TRABER, 2012; ROSS et al., 2014; GALLAGHER, 2013; TRABER, 2007). Dentro da célula, o transporte intracelular do  $\alpha$ -tocoferol entre os compartimentos e a membrana plasmática pode ocorrer através de proteínas associadas ao tocoferol ( $\alpha$ -TAP).  $\alpha$ -TAP's possuem atividade GTPase podendo regular sinalizações celulares promovida pelo  $\alpha$ -tocoferol (STOCKER; AZZI, 2000).

Segundo Yeung e Laquatra (2003), a absorção de todo o tocoferol pelo organismo é de apenas 20-40%. O  $\alpha$ -tocoferol é um antioxidante absorvido através da dieta ou outras fontes, portanto, é considerado exógeno possuindo atividade não-enzimática. A ação do  $\alpha$ -tocoferol é através da interceptação dos radicais livres gerados pelo metabolismo celular ou por outras vias, impedindo dessa forma a degradação lipídica e danos ao DNA (QUILES et al., 2002; CATANIA et al., 2009). A ação neuroprotetora desse antioxidante já foi descrita em diversos sistemas, pois atua na diminuição da produção do óxido nítrico através do bloqueio da enzima NOS, enzima produtora do óxido nítrico (OSAKADA et al., 2003), além de atuar em processos inflamatórios e na prevenção da apoptose gerada pela disfunção mitocondrial, esse composto também promove uma maior estabilização da membrana e possui um efeito inibitório na

peroxidação lipídica, quando os níveis de óxido nítrico se encontram em níveis aumentados (WEI et al., 1999; HALIT et al., 2019).

Estudos demonstraram que a ação do  $\alpha$ -tocoferol no SNC está relacionada à proteção da membrana de células desse sistema, além de promover um aumento dos níveis de glutatona e enzimas antioxidantes que são exógenas, como a SOD (superóxido dismutase), CAT (catalase) e GPx (glutatona peroxidase) (ZAIDI; BANU, 2004). Além dessa proteção mais central através do aumento das enzimas antioxidantes, o tratamento com  $\alpha$ -tocoferol também apresentou melhorias significativas na redução da progressão da doença de Alzheimer, como também melhorias em déficits cognitivos (SMITH et al., 1999; CASINI et al., 2006). No entanto, ainda há uma grande necessidade de validar os estudos relacionados à ação desse antioxidante em distúrbios comportamentais, mas alguns estudos já demonstraram um possível efeito ansiolítico do  $\alpha$ -tocoferol. Segundo De Carvalho e colaboradores (2019), o  $\alpha$ -tocoferol bloqueou o efeito ansiogênico potencializado pela cafeína na análise do comportamento tipo ansiedade em modelo de *zebrafish*.

Com isso, para o estudo da relação do comportamento tipo ansiedade e estresse oxidativo utilizando agentes farmacológicos, a fim de se verificar os possíveis potenciais ansiogênicos ou ansiolíticos, faz-se necessário utilizar modelos experimentais de ansiedade na investigação pré-clínica, a fim de analisar modulações farmacológicas, bem como seus mecanismos de ação (GRAEFF; ZANGROSSI, 2002), o *Danio rerio*, conhecido também como *zebrafish*, é uma espécie bastante utilizada para análises dessas modulações relacionadas à ansiedade, devido ao alto grau de confiabilidade que apresenta (BARROS et al., 2008; STEWART et al., 2014; STEWART; KALUEFF, 2015).

#### 1.6. ZEBRAFISH COMO MODELO EXPERIMENTAL DO COMPORTAMENTO TIPO ANSIEDADE

O *Danio rerio*, popularmente conhecido como *zebrafish*, é um dos modelos bastante utilizados para diversos estudos relacionados a neuropatologias, esse modelo animal é um pequeno peixe ciprinídeo, proveniente da Índia e do sudeste asiático (**figura 3**) (SUBBIAH E KAR, 2013). O modelo do *zebrafish* tem se destacado em comparação com modelos de

roedores, devido ao seu baixo custo, fácil manuseio e armazenamento (MONLEO'N, 2002), sendo utilizados em diversos estudos farmacológicos (MA, 2017; MAXIMINO, 2011, 2013), genéticos (HU, 2017), toxicológicos (NAGEL, 2002), em modelos de ansiedade (MAXIMINO, 2010; STEWART, 2011), e também já foram descritos na literatura o uso desse modelo em estudos de aprendizagem (AMORIN, 2017).

O modelo animal de *zebrafish* possui neurotransmissores clássicos de vertebrados, além de uma alta conservação organizacional do SNC. O cérebro do *zebrafish* possui sistemas neurais altamente conservados, com isso possui estruturas homologas a de mamíferos, sendo possível assim o desenvolvimento de estudos relacionados a alterações comportamentais, neuroquímicos e neuroanatômicos (MAXIMINO et al., 2011).



**Figura 3:** *Danio rerio* (*zebrafish*), variedade *longfin* (Riverpark Aquatics).  
Imagem: Wikipedia Commons)

Estudos que englobam dados neuroanatômicos, genéticos e evolutivos sugerem que áreas cerebrais como hipotálamo e bulbo olfatório são homologas ao hipocampo de mamíferos (MUELLER; WULLIMANN, 2009). Alguns autores sugerem que a região dorsomedial do telencéfalo do *zebrafish* é homologa a estrutura da amígdala de mamíferos, inferindo-se que essa região é correspondente ao sistema límbico (PORTAVELLA; TORRES; SALAS, 2004; SALAS et al, 2006; PANULA et al, 2010; MARTIN, 2011; MUELLER, 2011; MAXIMINO,

2012a). Quanto a sistemas neuroquímicos, já se identificou no sistema nervoso do *zebrafish* neurotransmissores gabaérgicos, serotoninérgicos, colinérgicos, dopaminérgicos, noradrenérgicos, histaminérgicos, glutamatérgicos, assim como sistemas monoaminérgicos (BARROS, 2008; MAXIMINO, HERCULANO, 2010). Por todas essas similaridades estruturais e neuroquímicas, o modelo do *zebrafish* para o desenvolvimento de estudos relacionados neuropatologias já é bem caracterizado. Maximino e colaboradores (2010), validaram estudos comportamentais relacionados a ansiedade como escototáxia, distribuição vertical eliciada pela novidade e campo aberto no modelo de *zebrafish*.

Diante de todos os estudos com o modelo de *zebrafish* para avaliar neuropatologias devido a homologia de algumas regiões neurais com a de mamíferos, faz-se interessante translacionar esses estudos para um melhor entendimento de algumas desordens humanas (EGAN, 2009; CACHAT, 2010). Alguns trabalhos sobre o comportamento tipo ansiedade e comportamentais gerados por modelos de estresse, tais como o teste de Preferência Claro/Escuro (PCE) e distribuição vertical eliciada pela novidade (DVN), demonstraram que o *zebrafish* possui sensibilidade a exposição a esses testes para avaliação de comportamentos relacionado ao estresse (MAXIMINO, 2010).

#### **1.6.1. Teste de distribuição vertical eliciada pela novidade para avaliação do comportamento tipo ansiedade**

O teste de distribuição vertical eliciado pela novidade (DVN) é utilizado para avaliar alguns parâmetros correspondente ao comportamento tipo ansiedade em *zebrafish*, sendo um teste bastante utilizado para o estudo de substâncias farmacológicas que busquem reduzir comportamentos ansiogênicos e de pânico (LEVIN; BENCAN; CERUTTI, 2007). Em seu *habitat* natural o *Danio rerio* possui um comportamento exploratório e sociável, sendo considerado um animal com tendências a se afastar da superfície, buscando um lugar seguro quando exposto em um ambiente novo. Com isso, o teste baseia-se na geotáxia, ou seja, na preferência em que o animal possui em se manter na parte inferior do aparato, evitando assim a superfície quando exposto em ambientes novos (CACHAT, 2010; STEWART, 2010).

Em ambiente novos, a tendência inicial do *zebrafish* é permanecer mais tempo no fundo, além de reduzir sua natação, exibir mais movimentos erráticos e episódios de congelamento.

Segundo CACHAT e colaboradores (2010), à medida que o peixe vai se adaptando ao novo ambiente, ocorre a gradual exploração da porção superior do aparato em que ele está inserido, no habitat natural essa exploração mais vertical é potencialmente perigosa, devido a possível presença de peixes ou pássaros predadores. Os parâmetros do teste DVN consistem em tempo gasto na região superior/inferior, a latência para entrar na parte superior, o número de cruzamentos entre as regiões e o número e/ou a duração do congelamento e movimentos erráticos (EGAN et al, 2009; WANG et al, 2015). Estresse e agentes farmacológicos podem modular o comportamento do *zebrafish* no teste DVN, como a exemplo de drogas ansiolíticas que tendem a aumentar o tempo gasto no topo, enquanto os ansiogênicos promovem um maior tempo gasto no fundo do aparato, imobilidade e movimentos errático (VIGNET et al., 2013).

Alguns testes são bem caracterizados para avaliação do comportamento tipo ansiedade em roedores, e o teste DVN é similar ao teste de labirinto em cruz elevada, onde o braço aberto e fechado corresponde ao tempo de exploração no topo e fundo do teste DVN, como também é relacionado ao centro e periferia do teste de campo aberto (LEVIN et al., 2007). Quando o *zebrafish* é exposto a substâncias farmacológicas, o comportamento tipo ansiedade é observado, quando o tempo em que o animal permanece explorando o fundo do aparato é consideravelmente maior em que o tempo que o animal explora a porção superior do aparato, inferindo-se que quando o animal explora mais o topo ele está apresentando um comportamento de caráter ansiolítico e quando ocorre o oposto, é de caráter ansiogênico (EGAN et al, 2009).

O modelo animal do *zebrafish* já se encontra bem caracterizado para o desenvolvimento de pesquisas comportamentais e neuroquímicas, muitas dessas pesquisas analisam substâncias farmacológicas devido esse modelo possuir uma alta taxa de reprodutibilidade, pois possui um sistema simples de manuseio. A utilização desse modelo para avaliar propriedades farmacológicas e moduladoras se mostra bastante promissora, assim sendo diversos estudos neurofarmacológicos podem ser realizados para avaliar distúrbios comportamentais e danos celulares. Com isso, a utilização dos testes comportamentais e bioquímicos com o modelo de *zebrafish*, permitem avaliar o comportamento tipo ansiedade, além de permitirem avaliar os efeitos farmacológicos relacionado a esse comportamento com o uso do anti-inflamatório não esteroideal, indometacina, e de antioxidantes como  $\alpha$ -tocoferol.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. OBJETIVO GERAL

O objetivo geral do estudo é avaliar o efeito da indometacina e do  $\alpha$ -tocoferol no comportamento tipo ansiedade e no estresse oxidativo em cérebro de *Danio rerio* (zebrafish).

### 2.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Caracterizar o efeito dose resposta do tratamento com indometacina em diferentes doses a partir da determinação da curva de sobrevivência em *Danio rerio*.
- Avaliar o efeito das doses de 0,5 mg/kg, 0,75 mg/kg, 1 mg/kg, 2,0 mg/kg e 3,0 mg/kg de indometacina na indução do comportamento tipo ansiedade em *Danio rerio*.
- Avaliar o efeito protetor do  $\alpha$ -tocoferol associado com as diferentes doses de indometacina no comportamento tipo ansiedade em *Danio rerio*.
- Avaliar o estresse oxidativo gerado pela indometacina nos cérebros dos animais
- Avaliar o efeito neuroprotetor do tratamento com  $\alpha$ -tocoferol associado com a indometacina em relação ao estresse oxidativo nos cérebros dos animais.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. ANIMAIS E ALOJAMENTO

Os experimentos foram realizados utilizando 160 peixes da espécie *Danio rerio*, ou popularmente chamados de paulistinha ou *zebrafish*, da linhagem *longfin* (n=10/ por grupo experimental), de sexo indefinido. Os animais foram adquiridos em um fornecedor local, localizado em Belém-PA. Os animais foram alojados em um aquário (50cm x 35cm x 30cm) com capacidade de 1 animal /L por um período mínimo de 7 dias para serem aclimatados com o novo ambiente, que antecederam os experimentos comportamentais. Os aquários foram mantidos de acordo com o protocolo de criação em biotério (DAMMSKI et al., 2011) adequados em condições de temperatura a  $25^{\circ}\text{C} \pm 2$  e um pH entre 6,5 - 7,0, ciclo circadiano de 14h no claro e 10h no escuro (luzes acendendo às 07:00h e apagando às 21:00h), sob constante controle de filtragem e oxigenação da água. Os animais foram alimentados duas vezes por dia. Os protocolos experimentais foram aprovados previamente pelo Comitê de Ética em pesquisas com Animais de Experimentação da Universidade Federal do Pará (CEPAE) através do processo CEPAE-UFPA:213-14.

#### 3.2. DROGAS E REAGENTES

Para a realização do estudo foram utilizados os agentes farmacológicos indometacina (INDOCID<sup>®</sup>), que é um anti-inflamatório bloqueador não seletivo da COX, nas doses de 0,5 mg/kg, 0,75 mg/kg, 1 mg/kg e 2 mg/kg, e o antioxidante  $\alpha$ -tocoferol (FLUKA, SIGMA-ALDRICH) administrado na dose de 2 mg/kg, com base em experimentos prévios realizados pelo nosso grupo. Todas as drogas foram diluídas em solução salina (NaCl) a 0,9% e dimetilsulfóxido (DMSO) a 1%. Os animais do grupo controle receberam solução salina a 0,9%. Para as análises bioquímicas foram utilizados os reagentes n-metil-2-fenilindol (NMFI), ácido metanossulfônico (SIGMA-ALDRICH), tampão TRIS, albumina de soro bovino (BSA), padrão de MDA-tetrametoxiprofano (SIGMA-ALDRICH), hidróxido de sódio (NaOH) a 1N e solução de Bradford.

### 3.3. GRUPOS EXPERIMENTAIS

Para a realização do estudo os animais foram distribuídos entre os grupos: controle (CTRL), indometacina 0,5 mg/kg (INDO 0,5 mg/kg), indometacina 0,75mg/kg (INDO 0,75 mg/kg) indometacina 1 mg/kg (INDO 1 mg/kg), indometacina 2 mg/kg (INDO 2 mg/kg), indometacina 3 mg/kg (INDO mg/kg),  $\alpha$ -tocoferol (TF), TF+INDO 1 mg/kg e TF+INDO 2 mg/kg, como demonstrado na **figura 4**. Os agentes farmacológicos foram administrados a um volume de 5  $\mu$ L nos animais via intraperitoneal (i.p) com uma seringa Hamilton®, 30 minutos antes da exposição ao teste comportamental. O intervalo de tempo entre as injeções nos animais que receberam o pré-tratamento foi de 30 min. Para anestésiar os animais utilizamos a crioanestesia antes da administração de cada tratamento. Todos os animais foram expostos ao teste de distribuição vertical eliciado pela novidade para avaliar o comportamento tipo ansiedade. Os experimentos foram sempre realizados entre as 08:00- 16:00 horas, e após avaliação do comportamento dos animais pelo teste DVN, realizou-se a dissecação dos cérebros dos animais para posterior análises bioquímicas.

<b>Grupos</b>	<b>Tratamento</b>
Controle (CTRL)	Salina 0,9%
Indometacina (INDO)	INDO 0,5 mg/kg
	INDO 0,75 mg/kg
	INDO 1,0 mg/kg
	INDO 2,0 mg/kg
	INDO 3,0 mg/kg
$\alpha$ -Tocoferol (TF)	TF 2,0 mg/kg
TF + INDO	TF + INDO 1,0 mg/kg
	TF + INDO 2,0 mg/kg

**Figura 4:** Representação dos grupos experimentais de acordo com o tratamento administrado.

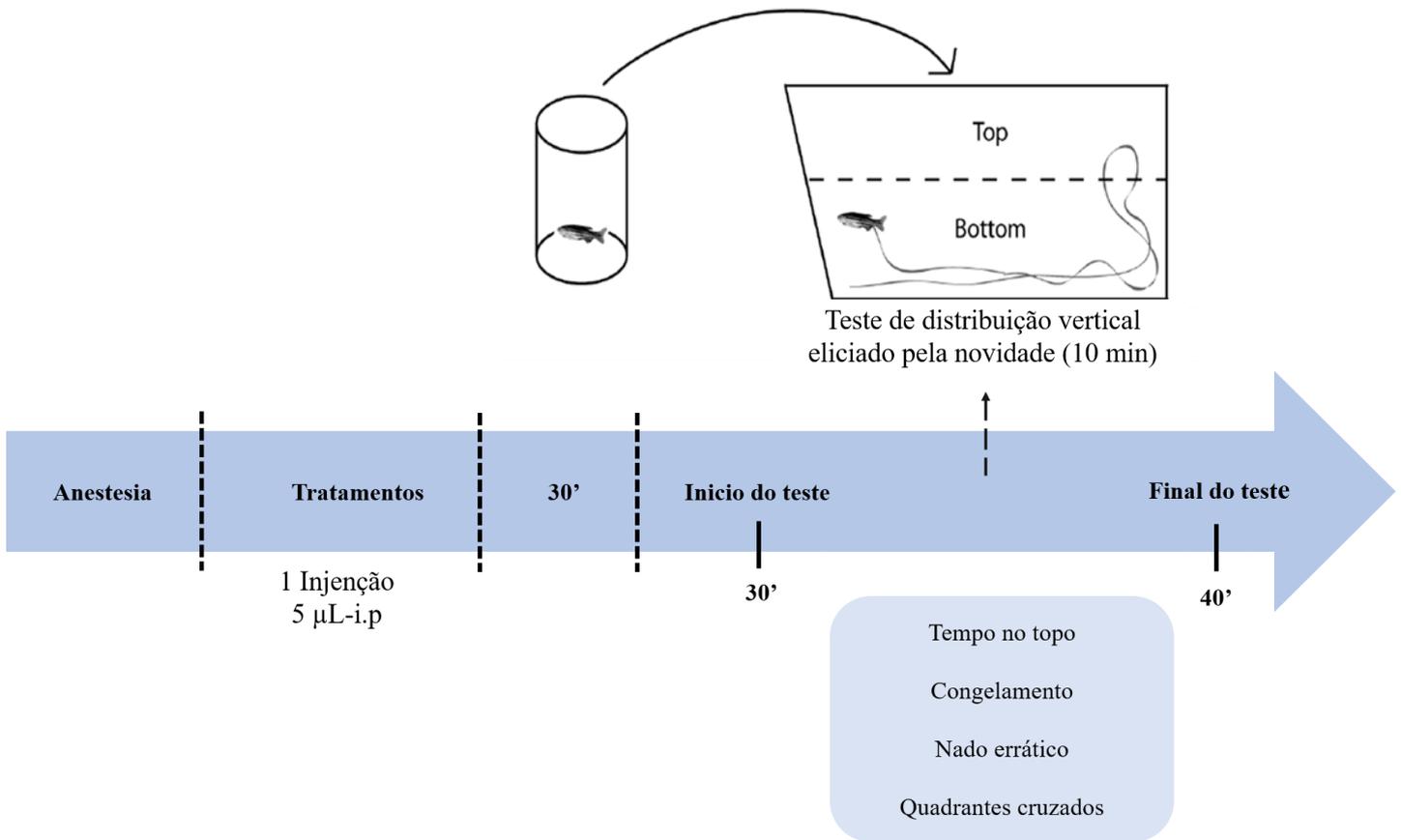
A escolha da dose de 2 mg de  $\alpha$ -*tocopherol* baseou-se em estudos realizados previamente pelo nosso grupo, onde foi demonstrado um efeito protetor, reduzindo o comportamento tipo ansiedade utilizando o teste de distribuição eliciada pela novidade em *Danio rerio*. Através de estudos com modelos animais utilizando a dose de 2 mg/kg de indometacina (HO et al., 2015), montamos uma curva dose-resposta com diferentes doses, para avaliar os efeitos dessas doses no teste DVN. As doses escolhidas foram as de 0,5 mg/kg; 0,75 mg/kg; 1 mg/kg; 2 mg/kg e 3 mg/kg.

#### 3.4. DISTRIBUIÇÃO VERTICAL ELICIADA PELA NOVIDADE

Para a realização do teste de distribuição vertical eliciada pela novidade os animais foram transferidos do aquário em que ficam armazenados para o aparato de teste, que consiste em um aquário (15cm largura x 30cm diâmetro x 22cm altura) completamente cheio de água, ressaltando que o aparato do teste possui diferentes dimensões do aquário de alojamento, como demonstrado. Após os 30 min do tempo farmacológico das drogas administradas os animais foram introduzidos individualmente e filmados por 10 min com uma câmera digital, filmando o aparato pela frente por 10 minutos, como demonstrado através do desenho esquemático da linha do tempo do teste DVN. O tanque foi dividido em uma grade 6 x 6 para análise da movimentação dos animais. Os seguintes parâmetros foram analisados:

- I. **Tempo no topo:** Duração de tempo despendido em segundos que o animal explora terço superior do aparato;
- II. **Número de quadrantes cruzados:** O número de vezes em que o animal cruza os quadrantes do aparato durante toda a sessão do teste.
- III. **Nado errático:** O número de eventos em que o animal muda de direção no aparato como um nado rápido, em zigue-zague e de curta-duração;
- IV. **Congelamento:** Duração do tempo em que o animal permanece imóvel, apenas com movimentos oculares e das guelras.

Para a avaliação dos vídeos se utilizou o *software* X-Plo-Rat 2005 por um avaliador cego aos grupos experimentais.



**Figura 5:** Representação esquemática da linha temporal do experimento realizado através do teste de distribuição vertical eliciado pela novidade (DVN), (CACHAT et al, 2010).

### 3.4.1. Ensaio de Peroxidação Lipídica

O ensaio de peroxidação lipídica foi realizado através do método colorimétrico descrito por Esterbauer e Cheeseman (1990). Este método consiste na obtenção de um cromóforo estável a partir da reação do n-metil-2-fenilindol (NMFI) com o ácido metanossulfônico, na presença de produtos da peroxidação lipídica, a exemplo do malonaldeído (MDA). Após a exposição ao teste comportamental, cada animal foi anestesiado por crioanestesia e decapitado com um bisturi. Seus cérebros foram dissecados em solução tampão fosfato, e foram rapidamente congelados sob  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , em microtubos com  $300\text{ }\mu\text{L}$  de Tampão TRIS (Trizma base) até a realização do ensaio bioquímico. As amostras foram descongeladas, sonicadas e, então,  $50\text{ }\mu\text{L}$  foram coletados para posterior quantificação de proteínas. Os restantes das amostras foram centrifugados a  $5600\text{ rpm}$  a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 10 minutos. Após a centrifugação,  $80\text{ }\mu\text{L}$  do sobrenadante foi coletado e adicionado em microtubos contendo NMFI e ácido metanossulfônico, os quais

foram mantidos em banho maria por 40 minutos. Após o tempo de reação, a solução foi pipetada em microplacas de 96 poços, em triplicata, e lida em um leitor de microplaca a 570 nm.

### 3.4.2. Quantificação de proteínas

A dosagem de proteína foi realizada afim de corrigir os dados obtidos através do ensaio de peroxidação lipídica, portanto as concentrações de MDA obtidas foram corrigidas pela quantidade de proteínas presente nas amostras, através do método de Bradford (BRADFORD, 1976). Para esta análise, foram adicionados à alíquota de proteína 150  $\mu$ L de NaOH e 200  $\mu$ L do reagente de Bradford (100 mg de Azul Brilhante Coomassie G-250, 50 mL de etanol 95%, 100 mL de ácido fosfórico 85% e 850 mL de água ultrapura) e incubadas por 5 minutos para ocorrer a reação, após esse tempo foi realizada a leitura por espectrofotometria observada, onde a mudança de absorbância das amostras foi quantificada em um leitor de microplaca 595 nm. Os valores de absorbância obtidos foram analisados com base em curva-padrão feita com albumina bovina (BSA).

### 3.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a realização das análises estatísticas dos dados obtidos do teste comportamental e bioquímico, a distribuição normal dos dados foi analisada pelo teste de Shapiro-Wilk, e a diferença entre as médias foi avaliado utilizando o teste ANOVA (análise de variância) de uma via, seguido dos pós-teste de *Bonferroni* e *tukey* para comparação entre os grupos dos testes comportamental e bioquímico, respectivamente. Todos os testes estatísticos foram realizados utilizando os softwares *GraphPad Prism* 8.0 e *BioEstat* 5.0. Os resultados referentes aos parâmetros comportamentais foram expressos em média  $\pm$  erro padrão, e os dados bioquímicos foram expressos em média  $\pm$  desvio padrão, sendo considerado  $p < 0,05$ .

## 4. RESULTADOS

### 4.1. A INDOMETACINA INDUZ O COMPORTAMENTO TIPO ANSIEDADE NO TESTE DE DISTRIBUIÇÃO VERTICAL ELICIADA PELA NOVIDADE EM *Danio rerio*.

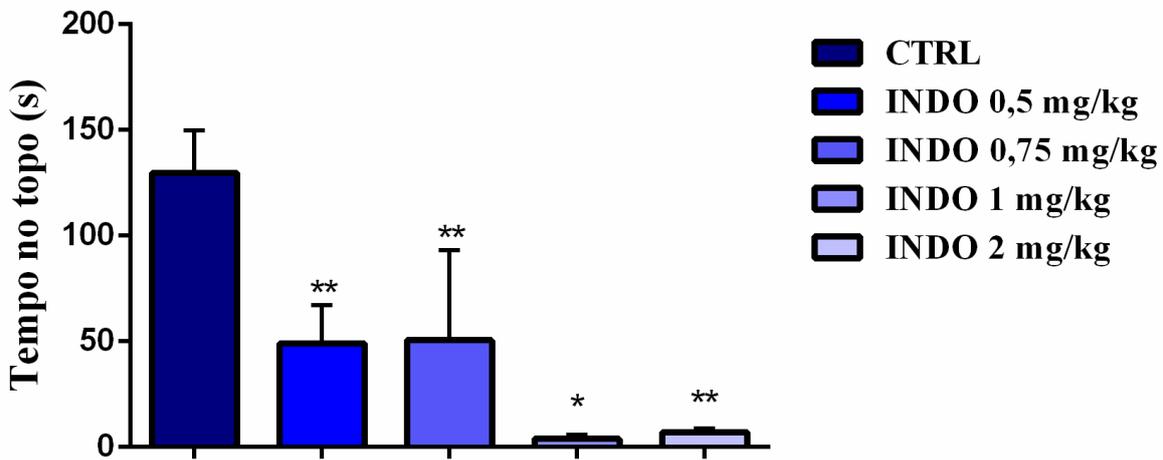
Para caracterizarmos a dose resposta mais efetiva de indometacina realizamos uma curva dose-resposta com as doses de 0,5 mg/kg, 0,75 mg/kg, 1 mg/kg, 2 mg/kg e 3 mg/kg. Após trinta minutos da administração da dose de 3 mg/kg todos os animais foram a óbito, demonstrando o efeito letal desta dose para os animais. As doses de 0,5 mg/kg, 0,75 mg/kg, 1 mg/kg, 2 mg/kg não apresentaram nenhum efeito de letalidade nos animais, como demonstrado na tabela de sobrevivência (**Tabela 2**).

#### Determinação da sobrevivência dos animais em função do tempo (n)

Grupos Experimentais	<i>Tempo após exposição a INDO (min)</i>						
	0	5	10	15	20	25	30
<b>CTRL</b>	38(100%)	38(100%)	38(100%)	38(100%)	38(100%)	38(100%)	38(100%)
<b>INDO 0,5 mg/kg</b>	20(100%)	20(100%)	20(100%)	20(100%)	20(100%)	20(100%)	20(100%)
<b>INDO 0,75 mg/kg</b>	21(100%)	21(100%)	21(100%)	21(100%)	21(100%)	21(100%)	21(100%)
<b>INDO 1,0 mg/kg</b>	29(100%)	29(100%)	29(100%)	29(100%)	29(100%)	29(100%)	29(100%)
<b>INDO 2,0 mg/kg</b>	34(100%)	34(100%)	34(100%)	34(100%)	34(100%)	34(100%)	34(100%)
<b>INDO 3,0 mg/kg</b>	15(100%)	13(86,6%)	8(53,3%)	4(26,6%)	4(26,6%)	0(0%)	0(0%)

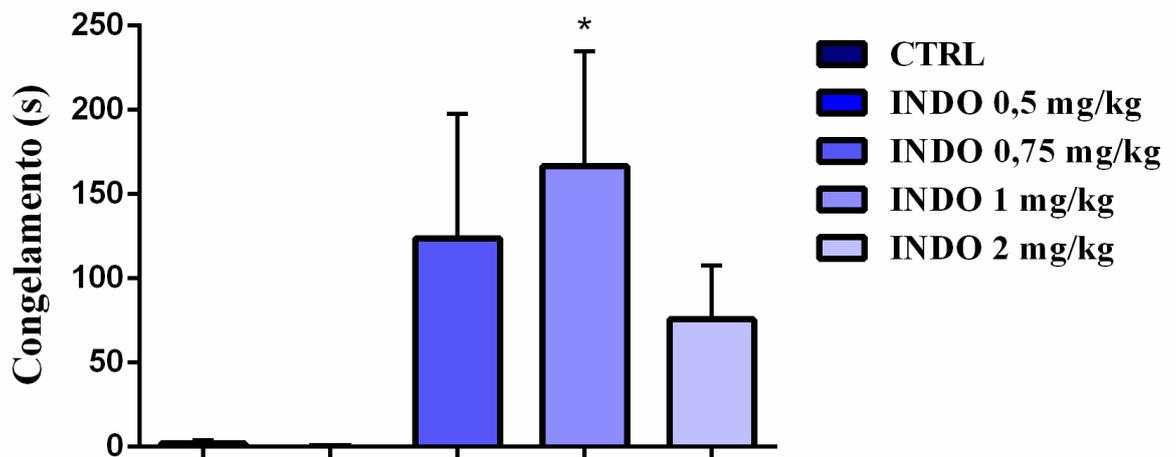
**Tabela 2:** Tabela de sobrevivência dos animais nos grupos experimentais em função do tempo após exposição á indometacina. A dose de 3,0 mg/kg de indometacina apresentou 0% de sobrevivência no decorrer dos 30 min após administração nos animais.

Para as análises comportamentais foram avaliados os parâmetros: tempo no topo, congelamento, nado errático e quadrantes cruzados. No parâmetro tempo no topo, os animais tratados com as doses de indometacina 0,5 mg/kg ( $49.12 \pm 16.23$ ), 0,75 mg/kg ( $8.02 \pm 3.52$ ), 1 mg/kg ( $3.98 \pm 1.75$ ) e 2 mg/kg ( $8.20 \pm 1.66$ ) foram diferentes estatisticamente do grupo CTRL ( $129.73 \pm 19.25$ ), como demonstrado na **figura 6**. Neste parâmetro se observou que os animais tratados com indometacina exploraram menos o topo do aparato quando comparado ao grupo controle, demonstrando assim que a indometacina está induzindo o comportamento tipo ansiedade nos animais. Não houve diferenças estatísticas entre grupos tratados com indometacina nas diferentes doses



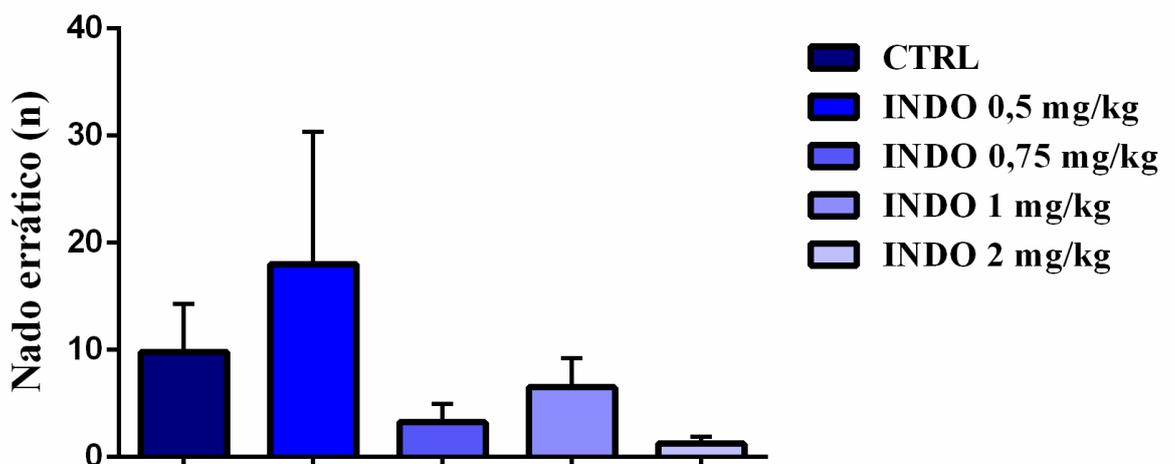
**Figura 6:** Efeito da indometacina no parâmetro comportamental tempo no topo utilizando o teste de distribuição vertical eliciada pela novidade em *Danio rerio*. Foi utilizada nesta análise o teste estatístico ANOVA uma via seguido do pós- teste de *tukey*. (Houve diferenças entre os grupos INDO ao CTRL \* $p < 0,05$  \*\* $p < 0,01$ ). Os dados foram expressos em MÉDIA ± ERRO PADRÃO.

No parâmetro de congelamento os grupos tratados com indometacina INDO 0,5 mg/kg ( $0.20 \pm 0.18$ ), 0,75 mg/kg ( $103.19 \pm 58.12$ ) e 2 mg/kg ( $58.17 \pm 64.17$ ) não demonstraram possuir diferenças estatísticas com o grupo CTRL ( $1.93 \pm 1.78$ ), no entanto se observou uma diferença entre os grupos CTRL e INDO 1 mg/kg (CTRL =  $1.93 \pm 1.78$  vs INDO 1 mg/kg =  $166.75 \pm 64.17$ ). E não houve diferenças entre os grupos tratados com indometacina no parâmetro tempo de congelamento.



**Figura 7:** Efeito da indometacina no parâmetro comportamental de congelamento utilizando o teste de distribuição vertical eliciada pela novidade em *Danio rerio*. Foi utilizada nesta análise o teste estatístico ANOVA uma via seguido do pós- teste de *tukey*. (Houve diferença entre o grupo INDO 1 mg/kg ao CTRL \* $p < 0,05$ ). Os dados foram expressos em MÉDIA  $\pm$  ERRO PADRÃO.

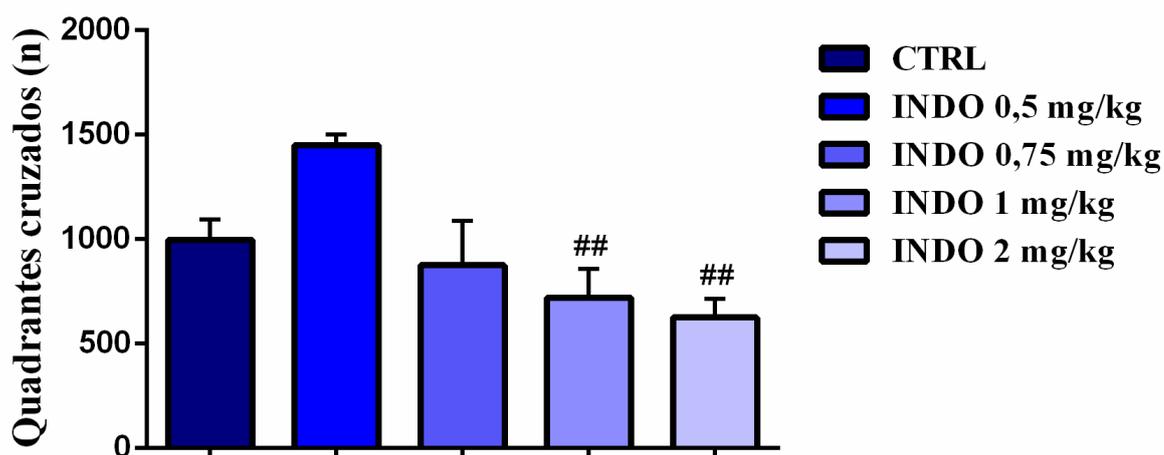
Na análise do parâmetro nado errático, não foi observado diferenças entre os grupos INDO 0,5 mg/kg ( $18.0 \pm 11.06$ ), INDO 0,75 mg/kg ( $6.16 \pm 3.43$ ), INDO 1 mg/kg ( $6.50 \pm 2.57$ ) e INDO 2 mg/kg ( $1.45 \pm 0.58$ ) ao serem comparados com o grupo CTRL ( $9.81 \pm 4.30$ ). Não houve diferenças também entre os grupos tratados com indometacina nas diferentes doses.



**Figura 8:** Efeito da indometacina no parâmetro comportamental nado errático utilizando o teste de distribuição vertical eliciada pela novidade em *Danio rerio*. Foi utilizada nesta análise o teste estatístico ANOVA de uma via seguido do pós- teste de *tukey*. MÉDIA  $\pm$  ERRO PADRÃO.

Ao analisar o parâmetro de quadrantes cruzados, afim de se verificar diferenças na motilidade do animal, se observou que o grupo INDO 0,5 mg/kg apresentou diferenças estatísticas com os grupos INDO 1 mg/kg (INDO 0,5 mg/kg =  $1450.2 \pm 46.52$  vs INDO 1 mg/kg =  $721.5 \pm 137.59$ ) e INDO 2 mg/kg (INDO 0,5 mg/kg =  $1450.2 \pm 46.52$  vs INDO 2 mg/kg =  $588.18 \pm 90.27$ ), no entanto não houve diferença entre os grupos INDO 0,5 mg/kg e INDO 0,75 mg/kg (INDO 0,5 mg/kg =  $1450.2 \pm 46.52$  vs INDO 0,75 mg/kg =  $876.5 \pm 193.80$ ). Essa diferença do grupo INDO 0,5 mg/kg com os grupos INDO 1 mg/kg e INDO 2 mg/kg demonstra um aumento exacerbado da locomoção dos animais referente ao grupo INDO 0,5 mg/kg. Não houve diferenças entre os grupos tratados com indometacina em comparação ao grupo controle (CTRL =  $998.18 \pm 96.56$ ).

Observamos que as análises dos grupos INDO 0,5 mg/kg e INDO 0,75 mg/kg apresentaram um erro padrão intensificado quando comparado aos grupos INDO 1 mg/kg e INDO 2 mg/kg no parâmetro tempo no topo, e a dose de INDO 0,5 mg/kg apresentou também uma exploração de forma intensificado dos quadrantes do aparato de teste, podendo estar relacionado a danos locomotores dos animais deste grupo. Portanto, os grupos INDO 1 mg/kg e INDO 2 mg/kg serão utilizados para as posteriores avaliações dos parâmetros comportamentais e bioquímicos.

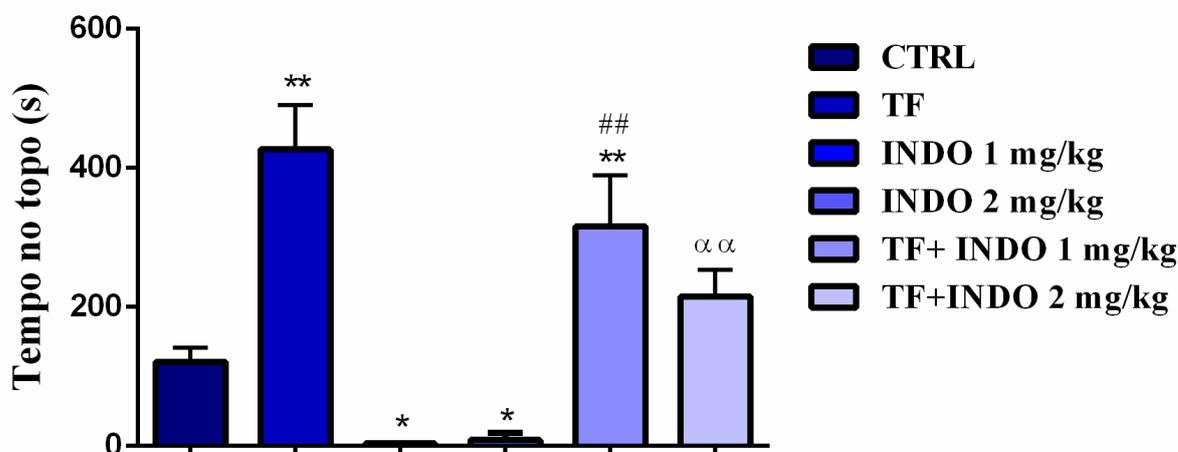


**Figura 9:** Efeito da indometacina no parâmetro comportamental tempo no topo utilizando o teste de distribuição vertical eliciada pela novidade em *Danio rerio*. Foi utilizada nesta análise o teste estatístico ANOVA uma via seguido do pós- teste de *tukey*. (Houve diferenças entre o grupo INDO 0,5 mg/kg aos grupos INDO 1 mg/kg e 2 mg/kg ## $p < 0,01$ ). Os dados foram expressos em MÉDIA ± ERRO PADRÃO.

#### 4.2. O COMPORTAMENTO TIPO ANSIEDADE INDUZIDO PELA INDOMETACINA É PREVINIDO PELO ANTIOXIDANTE $\alpha$ -TOCOFEROL NO TESTE DE DISTRIBUIÇÃO VERTICAL ELICIADA PELA NOVIDADE EM *Danio rerio*.

Os resultados obtidos no teste de distribuição vertical eliciado pela novidade demonstraram que o pré-tratamento com  $\alpha$ -tocoferol protegeu os animais frente ao comportamento tipo ansiedade induzida pelas doses de indometacina. No parâmetro analisado tempo no topo o grupo  $\alpha$ -tocoferol associado a indometacina na dose de 1 mg/kg aumentou o tempo de exploração dos animais no topo do aparato em comparação ao grupo INDO 1 mg/kg e controle (TF+INDO 1 mg/kg =  $338.79 \pm 74.76$  vs INDO 1 mg/kg =  $3.98 \pm 1.75$ ;  $p < 0.01$ ; T+INDO 1 mg/kg =  $338.79 \pm 74.76$  vs CTRL =  $129.73 \pm 19.25$ ;  $p < 0.01$ ).

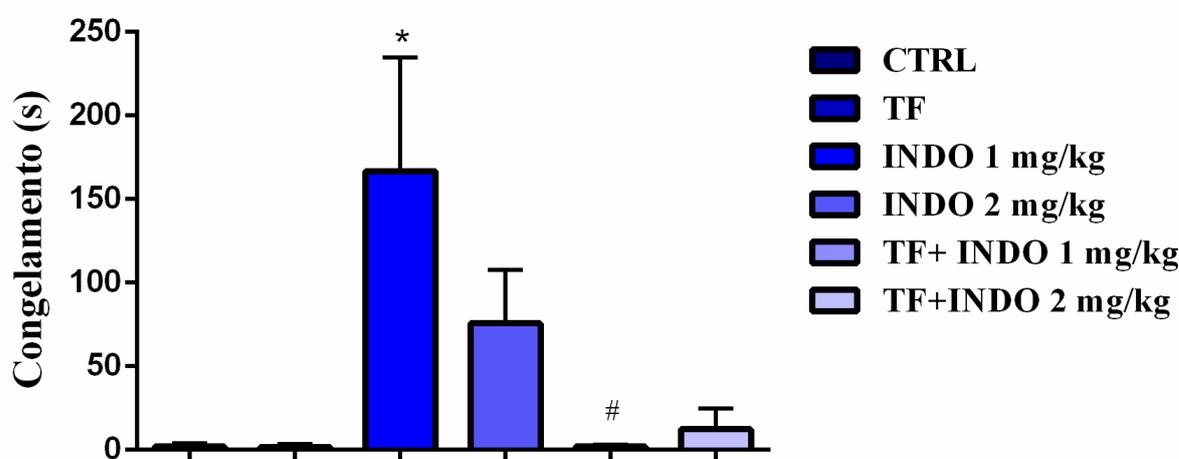
O grupo TF+INDO 2mg/kg também apresentou diferença significativa em comparação ao grupo INDO 2 mg/kg (TF+INDO 2mg/kg =  $201.87 \pm 38.87$  vs INDO 1 mg/kg =  $3.98 \pm 1.75$ ;  $P < 0.01$ ) no parâmetro tempo no topo, ou seja, o grupo TF+INDO 2 mg/kg induziu uma diminuição no tempo despendido no fundo do aparato como foi observado antes nos grupos experimentais somente com indometacina. Não houve diferenças significativas entre os grupos TF+INDO 1 mg/kg ( $338.79 \pm 74.76$ ), TF+INDO 2 mg/kg ( $201.87 \pm 38.87$ ) e CTRL ( $129.73 \pm 19.25$ ).



**Figura 10:** Efeito da indometacina após o tratamento com  $\alpha$ -tocoferol no parâmetro comportamental tempo no topo utilizando o teste de distribuição vertical eliciada pela novidade em *Danio rerio*. Foi utilizada nesta análise o teste estatístico ANOVA uma via seguido do pós- teste de *tukey*. (Houve diferenças entre o grupo CTRL aos grupos TF, INDO 1 mg/kg, 2 mg/kg e TF+INDO 1 mg/kg (\* $p < 0,05$  \*\* $p < 0,01$ ); do grupo INDO 1 mg/kg com o grupo TF+INDO 1 mg/kg ## $p < 0,01$ ; e entre os grupos INDO 2mg/kg e TF+INDO 2mg/kg  $\alpha\alpha p < 0,01$ ). Os dados foram expressos em MÉDIA  $\pm$  ERRO PADRÃO.

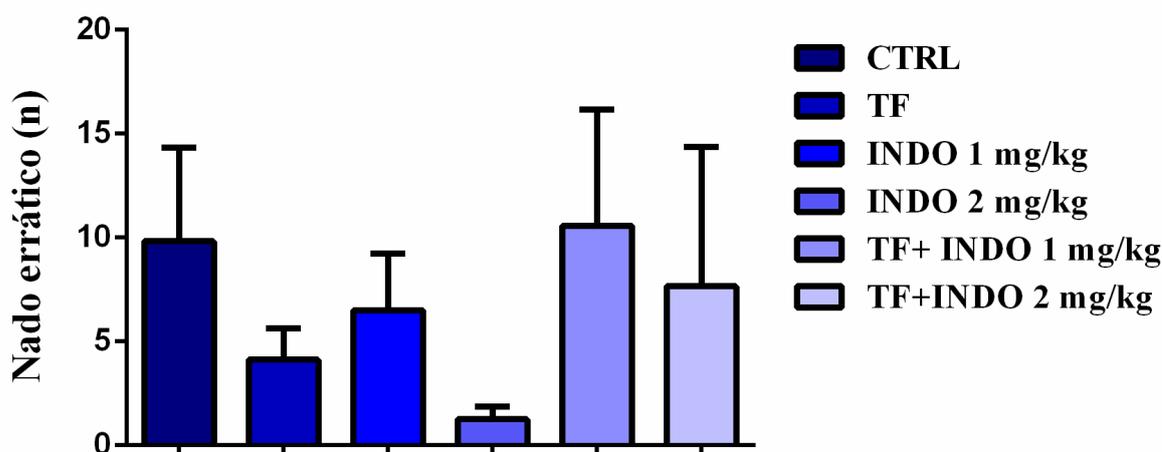
No parâmetro de congelamento o grupo INDO 1 mg/kg apresentou um aumento no tempo em que os animais permaneceram sem movimentação dentro do aparato em comparação aos animais dos grupos CTRL e  $\alpha$ -tocoferol (INDO 1 mg/kg =  $166.75 \pm 64.17$  vs CTRL =  $1.93 \pm 1.78$ ;  $P < 0.01$ ; INDO 1 mg/kg =  $166.75 \pm 64.17$  vs TF =  $1.93 \pm 1.64$ ;  $p < 0.05$ ), demonstrando assim que a indometacina nesta dose aumentou o efeito de congelamento nos animais.

O aumento do tempo em que os animais permaneceram sem movimento induzido pela indometacina na dose de 1 mg/kg foi intensamente reduzido pelo grupo TF+INDO 1mg/kg (INDO 1 mg/kg =  $166.75 \pm 64.17$  vs TF+INDO 1 mg/kg =  $1.94 \pm 1.16$ ;  $p < 0.05$ ), como observado na **figura 11**. No entanto não foi observada diferença significativa no grupo indometacina a 2mg/kg ( $58.17 \pm 30.80$ ) em comparação aos grupos CTRL ( $1.93 \pm 1.78$ ), INDO 1 mg/kg ( $166.75 \pm 64.17$ ), tocoferol ( $1.76 \pm 1.64$ ), TF+INDO 1 mg/kg ( $1.94 \pm 1.16$ ), TF+INDO 2 mg/kg ( $12.43 \pm 11.35$ ).



**Figura 11:** Efeito da indometacina após o tratamento com  $\alpha$ -tocoferol no parâmetro comportamental de congelamento utilizando o teste de distribuição vertical eliciada pela novidade em *Danio rerio*. Foi utilizada nesta análise o teste estatístico ANOVA uma via seguido do pós- teste de *tukey*. (Houve diferenças entre o grupo CTRL e grupo INDO 1 mg/kg (\* $p < 0,05$ ); do grupo INDO 1 mg/kg com o grupo TF+INDO 1 mg/kg # $p < 0,05$ ). Os dados foram expressos em MÉDIA  $\pm$  ERRO PADRÃO.

Na análise do parâmetro nado errático observamos que não houve diferença entre os grupos tratados com indometacina nas doses de 1 mg/kg ( $4.125 \pm 1.39$ ) e 2 mg/kg ( $6.5 \pm 2.57$ ) em comparação ao grupo CTRL ( $9.81 \pm 4.3$ ), como também não houve diferença com os grupos tratados com  $\alpha$ -tocoferol ( $4.12 \pm 1.39$ ) e  $\alpha$ -tocoferol mais indometacina (TF+INDO 1 mg =  $10.57 \pm 5.16$ ; TF+INDO 2mg/kg =  $7.66 \pm 6.13$ ), como observado na **figura 12**.



**Figura 12: Efeito da indometacina após o tratamento com  $\alpha$ -tocoferol no parâmetro comportamental nado errático utilizando o teste de distribuição vertical eliciada pela novidade em *Danio rerio*. Foi utilizada nesta análise o teste estatístico ANOVA uma via seguido do pós- teste de *tukey*. Valores mostrados como MÉDIA ± ERRO PADRÃO.**

Em relação ao número de quadrantes cruzados não foram observadas diferenças significativas entre os grupos INDO 1 mg/kg ( $721.5 \pm 137.59$ ) e INDO 2 mg/kg ( $588.18 \pm 90.27$ ) em comparação ao grupos CTRL ( $998 \pm 96.56$ ), como também nos grupos TOCOFEROL ( $730 \pm 130.13$ ), TF+INDO 1 mg/kg ( $698.42 \pm 108.73$ ) e TF+INDO 2mg/kg ( $735 \pm 117$ ), com isso não houve alteração locomotora induzida pelo tratamento com  $\alpha$ -tocoferol isolado ou associado a indometacina nas diferentes doses.

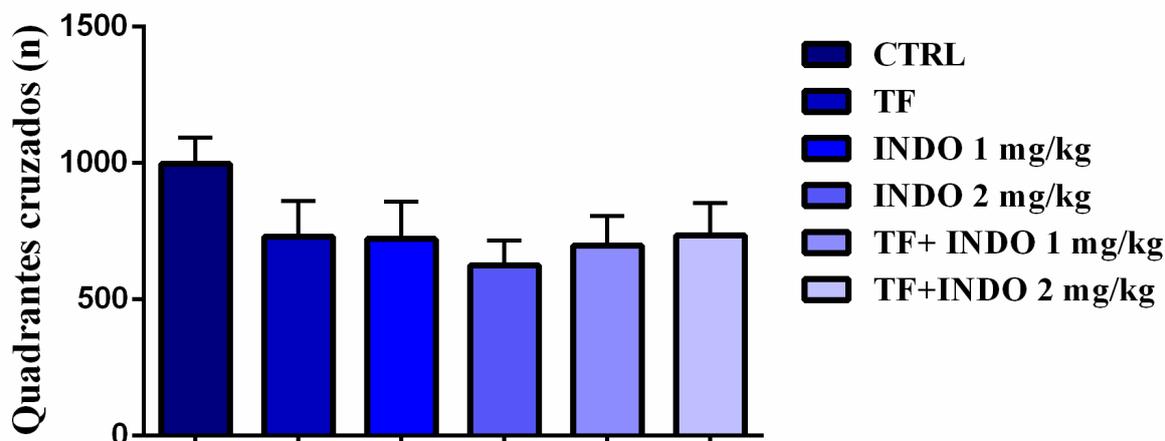


Figura 13: Efeito da indometacina após o tratamento com  $\alpha$ -tocoferol no parâmetro comportamental quadrantes cruzados utilizando o teste de distribuição vertical eliciada pela novidade em *Danio rerio*. Foi utilizada nesta análise o teste estatístico ANOVA uma via seguido do pós- teste de *tukey*. Valores mostrados como MÉDIA  $\pm$  ERRO PADRÃO.

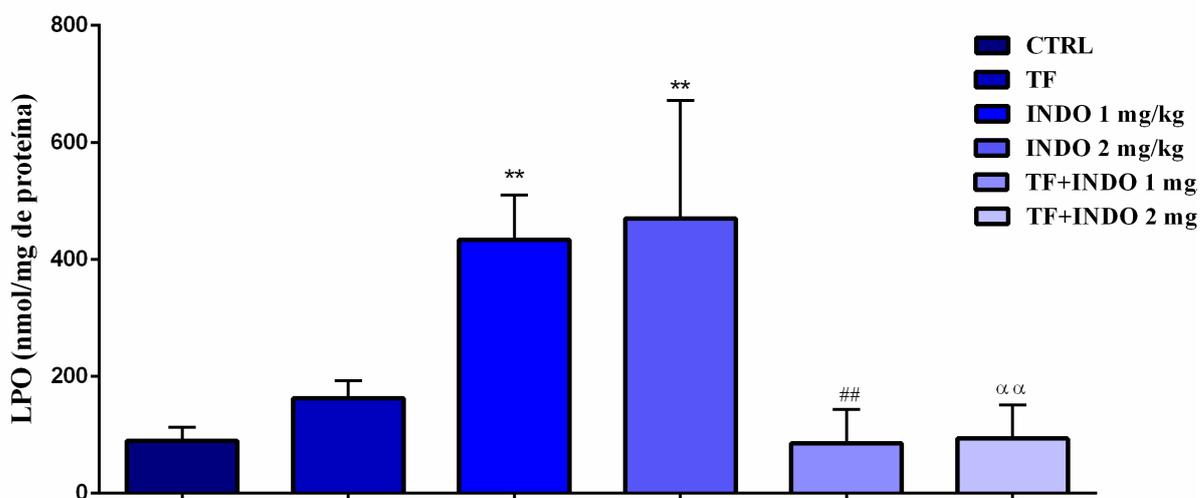
#### 4.3 O ESTRESSE OXIDATIVO INDUZIDO PELA INDOMETACINA FOI PREVINIDO PELO $\alpha$ -TOCOFEROL

Através do ensaio de peroxidação lipídica observamos os níveis de malonaldeído nas amostras de encéfalos do *zebrafish*, após a exposição as diferentes doses de indometacina. Nas amostras do grupo INDO 1 mg/kg observamos um aumento dos níveis de MDA em relação ao grupo controle (INDO 1 mg/kg =  $433.61 \pm 76.28$  vs CTRL =  $89.93 \pm 23.39$ ), esse aumento também foi observado na comparação do grupo INDO 2 mg/kg em comparação ao grupo controle (INDO 2 mg/kg =  $523 \pm 223.14$  vs CTRL =  $89.93$ ).

O pré-tratamento com  $\alpha$ -tocoferol exerceu um efeito protetor no cérebro dos animais tratados com indometacina. Os dados demonstram que não houve diferenças estatísticas entre os grupos TF ( $162.9 \pm 29.76$ ) e CTRL ( $89.93 \pm 23.39$ ). Não houve também diferenças entre o grupo CTRL e os grupos TF+INDO 1 mg/kg ( $85.67 \pm 58.04$ ) e TF+INDO 2 mg/kg ( $93.86 \pm 57.43$ ). No entanto o grupo TF diferiu estatisticamente dos grupos INDO 1 mg/kg e INDO 2 mg/kg (INDO 1 mg/kg =  $433.6 \pm 76.28$  vs TF =  $162.9 \pm 29.76$ ; INDO 2 mg/kg =  $523 \pm 223.14$  vs TF =  $162.9 \pm 29.76$ ).

Em comparação entre os grupos somente TF ( $162.9 \pm 29.76$ ) e TF+INDO 1 mg/kg ( $85.67 \pm 58.04$ ) e TF+INDO 2 mg/kg ( $93.86 \pm 57.43$ ) não houveram diferenças significativas. Porém foi observado que entre INDO 1 mg/kg apresentou níveis mais elevados de MDA em comparação ao grupo TF+INDO 1 mg/kg (INDO 1 mg/kg =  $433.6 \pm 76.28$  vs TF+INDO 1 mg/kg =  $85.67 \pm 58.04$ ), o mesmo foi observado entre os grupos INDO 1 mg/kg e TF+INDO 2 mg/kg (INDO 1 mg/kg =  $433.6 \pm 76.28$  vs TF+INDO 2 mg/kg =  $93.87 \pm 57.43$ ).

Se observou diferenças também nos níveis dosados de MDA entre os grupos INDO 2 mg/kg e TF+INDO 1 mg/kg (INDO 2 mg/kg =  $523.51 \pm 223.14$  vs TF+INDO 1 mg/kg =  $85.67 \pm 58.04$ ). Foi observado diferenças também entre os grupos INDO 2 mg/kg e TF+INDO 2 mg/kg (INDO 2 mg/kg =  $523.51 \pm 223.14$  vs TF+INDO 2 mg/kg =  $93.87 \pm 57.43$ ), demonstrando assim que o tratamento com  $\alpha$ -tocoferol exerceu um efeito de proteção do cérebro frente ao aumento dos níveis de MDA induzido pela indometacina.



**Figura 14: Efeito da indometacina antes e após o tratamento com  $\alpha$ -tocoferol no ensaio de peroxidação lipídica, onde os níveis de MDA foram dosados nos cérebros do zebrafish.** Foi utilizada nesta análise o teste estatístico ANOVA uma via seguido do pós- teste de *Bonferroni*. (Houve diferenças entre o grupo CTRL aos grupos INDO 1 mg/kg, 2 mg/kg (\*\* $p < 0,01$ ); do grupo INDO 1 mg/kg com o grupo TF+INDO 1 mg/kg ## $p < 0,01$ ; e entre os grupos INDO 2mg/kg e TF+INDO 2mg/kg  $\alpha\alpha p < 0,01$ ). Os dados foram expressos em MÉDIA  $\pm$  ERRO PADRÃO.

## 5. DISCUSSÃO

A indometacina é um dos anti-inflamatórios não esteroidais mais utilizados para o tratamento de doenças como osteoartrite e artrite reumatoide, no entanto o seu uso está associado a efeitos adversos de lesões na mucosa gastrointestinal, sendo um dos AINES mais prejudiciais a esse sistema (SOSTRES et al., 2013). As alterações ocasionadas pela indometacina através dos seus efeitos adversos, podem também estar relacionada a disfunções neuroquímicas, pois este fármaco está atuando na disfunção mitocondrial e aumento do estresse oxidativo (KHAN et al., 2019).

Estudos evidenciam a associação entre AINES e neuropatologias, pois os efeitos adversos desses medicamentos no sistema gastrointestinal podem estar envolvidos na indução da ansiedade, devido a pacientes com distúrbio no trato digestivo apresentarem uma alta prevalência de alterações neuropsicológicas, dentre elas o transtorno de ansiedade (GOODWIN et al., 2013). Com isso, através dos nossos resultados demonstramos que, a indometacina está envolvida na indução do comportamento tipo ansiedade, além de aumentar os níveis de estresse oxidativos no cérebro de *zebrafish*. E essas alterações comportamentais e oxidativas foram prevenidas através do tratamento com  $\alpha$ -tocoferol, que é um potente antioxidante com ação neuroprotetora frente a danos causados pela peroxidação lipídica.

Para o estudo de alterações neurocomportamentais e bioquímicas dos transtornos de ansiedade gerada por fármacos, modelos experimentais em animais, a exemplo de roedores são bastante utilizados. No entanto, a crescente busca por outros modelos animais que respondessem a modulações farmacológicas do comportamento tipo ansiedade faz-se interessante, e assim, o *Danio rerio* (*zebrafish*) surge apresentando uma alta confiabilidade em análises do seu comportamento, sendo bem caracterizado para estudos de comportamentos gerados por estressores como administrações farmacológicas de substâncias que possuem efeitos ansiogênicos dependentes de doses, como a cafeína (MAXIMINO, 2011), substâncias de alarme (substância extraída da epiderme do animal), e físicos, como o confinamento do animal por um determinado tempo em recipientes que impeçam sua movimentação (WONG et al., 2010; PIATO et al., 2011), com isso apresentando uma resposta efetiva a modulações relacionadas a ansiedade. O teste de distribuição vertical eliciado pela novidade (DVN), foi utilizado para avaliar o comportamento tipo ansiedade dos animais neste estudo, este teste

baseia-se na geotáxia, sendo utilizado há um longo período para avaliar o comportamento tipo ansiedade (LEVIN et al., 2007) e respostas a medicamentos (STEWART et al., 2014) em *zebrafish*. Através do teste DVN, o comportamento do *zebrafish* conflitua entre a busca por um ambiente “seguro” e a exploração da porção superior do aparato, este comportamento é similar ao que é observado no teste de campo aberto em modelos murinos, no qual há também um conflito do animal em permanecer próximo as paredes do aparato (ambiente seguro) ou explorar o centro (CHOLERIS et al., 2001).

Portanto, o modelo de *zebrafish*, é bastante utilizado para avaliação do comportamento tipo ansiedade, que consiste numa maior exploração do animal na porção inferior do aparato, assim como uma maior ocorrência de episódios de congelamentos, como também o de nados erráticos (MAXIMINO et al., 2010). Ainda há poucos estudos que demonstrem o comportamento tipo ansiedade gerado pela indometacina em modelos de *zebrafish*, no entanto pode-se observar que há diversos estudos em camundongos que elucidam os efeitos comportamentais da indometacina, através do teste de campo aberto.

Corroborando com dados já descritos na literatura, onde demonstram que a indometacina é um dos AINES mais prejudiciais a mucosa gastrointestinal, a citotoxicidade gerada por este anti-inflamatório foi observada através da análise de sobrevivência, onde a dose de 3 mg/kg se mostrou letal para os animais, induzindo uma letalidade de 100%. O mecanismo pelo qual a exposição a indometacina causa toxicidade em vários órgãos não é bem compreendido e não foi completamente elucidado. Porém, a inibição da síntese de prostaglandinas e da respiração celular, dano ao DNA e aumento do estresse oxidativo são considerados fatores envolvidos na patogênese da toxicidade induzida por esse medicamento (BASIVIREDDY et al., 2002). Com isso, a indometacina gera danos no sistema gastrointestinal, levando a lesões hemorrágicas no intestino delgado culminando em mortes por peritonite (KHAN et al., 2019; CARRASCO-POZO et al., 2015). Em modelos experimentais de roedores, a indometacina apresentou uma alta letalidade nas doses de 10 mg/kg e 20 mg/kg (SILVA et al., 2016), indicando assim que dependendo do organismo a toxicidade da indometacina possui um maior espectro relacionado a dose.

A ação farmacológica da indometacina na indução do comportamento tipo ansiedade foi observada através do parâmetro tempo no topo do teste DVN, onde a droga diminuiu o tempo de exploração na porção superior, esse dado demonstra que a baixa interação com o

compartimento aversivo dos animais tratados com indometacina potencializou a ansiogênese. Esse efeito já é bem caracterizado após o tratamento com drogas ansiolíticas como substância de alarme (substâncias extraídas de células da epiderme, da própria espécie e assim induzindo respostas específicas em co-específicos, e doses sub-convulsivantes de pentilenotetrazol ou cafeína gerando uma baixa e ineficiente exploração do compartimento aversivo (WONG et al., 2010). Diante disso, é interessante ressaltar que a indometacina está modulando mediadores inflamatórios e oxidativos que podem levar a alterações no SNC (ADHIKARY et al., 2011; BERCIK et al., 2009), desencadeando assim a geração do comportamento tipo ansiedade. Em consonância com os nossos resultados, a amplificação do comportamento tipo ansiedade gerado pela indometacina, foi observado também em roedores após estressores físicos com a administração desse medicamento (FERNANDEZ-GUASTI; MARTINEZ-MOTA, 2003; FRYE; SELIGA, 2001).

No entanto, alguns estudos abordam a relação do estresse com mediadores inflamatórios, onde a indometacina pode atenuar o aumento de alguns hormônios e neurotransmissores envolvidos na regulação de diversos efeitos neurológicos relacionados a neuroinflamação do cérebro (BULLER et al., 1998; ROTHWELL et al., 1999), indicando assim que este inflamatório pode atuar na diminuição do efeito ansiogênico gerados por alguns estressores farmacológicos ou físicos em uma dose mais elevada das quais utilizamos, 10 mg/kg, em modelo de roedores. Porém, observamos uma alta letalidade no modelo animal escolhido ao utilizarmos a dose de 3 mg/kg como já mencionado. Essa discordância em relação a resposta da indometacina frente a indução ou proteção do comportamento tipo ansiedade, é baseada na multifatoriedade das vias que podem gerar esse comportamento, sejam elas inflamatórias e/ou oxidativas. Segundo Sulakhiya e colaboradores, a administração de AINES induz a uma diminuição da expressão de citocinas pro-inflamatórias no hipocampo, como IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-6. Essas citocinas estão relacionadas a uma diminuição do comportamento tipo ansiedade, no entanto nossos dados sugerem que a indometacina, embora diminua a expressão de algumas citocinas pro-inflamatórias através do bloqueio da COX-2, está induzindo o comportamento tipo ansiedade, logo esse tipo de medicamento possui outra forma de indução a danos neurocomportamentais, podendo estar relacionados ao aumento do estresse oxidativo no cérebro. Alguns estudos, já reportados na literatura, demonstram que AINES, a exemplo da indometacina, podem modular o aumento da produção de espécies reativas do oxigênio e estresse oxidativo, que são mecanismos de toxicidade gerado através dos efeitos adversos dessa classe de medicamento (FAROOQ et al., 2007).

Em relação ao parâmetro de inibição comportamental (congelamento) do teste DVN, a indometacina intensificou a ausência de movimentos nos animais quando administrada a dose de 1 mg/kg, esse comportamento está associado a um elevado grau de ansiedade. A redução da exploração do compartimento superior associada ao aumento do tempo em que animal permanece sem se movimentar são relacionadas ao comportamento tipo ansiedade e medo (KALUEFF, 2014). Em consonância com os nossos resultados, alguns estudos já demonstraram em diferentes modelos animais que há um aumento de episódios de congelamento quando esses animais são expostos a manipulações farmacológicas que induzem o comportamento tipo ansiedade ou a testes comportamentais, seja eles de avaliação a nível exploratório como o teste de campo aberto e DVN, ou que exijam mais esforço físico, como o teste de nado forçado (YANG, et al., 2016; EGAN, et al., 2009). Apesar do parâmetro nado errático mostrar uma tendência de aumento no grupo INDO 0,5 mg/kg e já ter sido descrito como indicativo de ansiedade, não foi observada nenhuma diferença estatística entre todos os grupos indometacina e o controle.

Ao se analisar o comportamento tipo ansiedade através do teste DVN, é interessante analisar se a exploração vertical inibida ou estimulada é resultado de uma alteração locomotora ocasionada pela substância farmacológica utilizado no estudo, podendo assim não demonstrar de fato a indução do comportamento tipo ansiedade (ROSEMBERG et al, 2012; NEELKANTAN et al, 2013). A exploração vertical reduzida também pode representar atividade de natação inibida na presença de agentes sedativos (por exemplo, altas concentrações de sedativos de etanol) e não refletem necessariamente estados de ansiedade aumentados. Através do parâmetro de quadrantes cruzados, onde se contabiliza a quantidade de quadrantes percorridos dentro do aparato do teste de distribuição vertical eliciado pela novidade, é possível avaliar o efeito locomotor e ansiogênico ou ansiolítico (ROSEMBERG et al., 2012). Nossos resultados demonstram que não houveram diferenças estatísticas entre os grupos indometacina e o grupo controle, indicando que a menor exploração da porção aversiva do aparato não está relacionada ao dano locomotor através da manipulação do anti-inflamatório nos animais, portanto, a indometacina de fato está exercendo um efeito ansiogênico.

A ansiedade é uma neuropatologia multifatorial, e diversos estudos indicam que o estresse oxidativo pode estar envolvido na modulação desse transtorno (NG et al., 2008). Segundo Bouayed e colaboradores (2007), há uma correlação positiva entre marcadores de estresse oxidativo periférico e comportamento tipo ansiedade. Em modelos de roedores, vários

estudos relataram o envolvimento do estresse oxidativo em comportamentos semelhantes à ansiedade (VOLLERT et al., 2011; DHINGRA et al., 2014). Desrumaux e colaboradores (2010), demonstraram que níveis diminuídos de vitamina E e níveis aumentados de marcadores de estresse oxidativo central, como óxidos de colesterol e peróxidos celulares, resultam em comportamento ansiogênico em camundongos. Vários estudos em modelos animais sugerem que alterações genéticas ou farmacológicas do equilíbrio redox produzem mudanças comportamentais relacionadas a transtornos de ansiedade. O aumento da peroxidação lipídica, altera os níveis das defesas antioxidantes, como a glutathiona, além de gerar danos no DNA e redução da atividade de enzimas antioxidantes (MELO et al., 2013; BOUAYED et al., 2009; JANGRA et al., 2014). E o tratamento com antioxidantes parece prevenir muitos desses efeitos (NAGAHARA et al., 2013; TARBALI; KHEZRI, 2015).

Devido ao efeito ansiogênico da indometacina demonstrado por nossos resultados, e alguns estudos já associaram os efeitos adversos desse medicamento ao aumento do estresse oxidativo, se fez interessante administrar o  $\alpha$ -tocoferol, que é um potente antioxidante, com o intuito de avaliar sua regulação oxidativa frente aos danos comportamentais gerados pela indometacina. De Carvalho e colaboradores (2019), demonstraram que o  $\alpha$ -tocoferol diminui a intensificação do comportamento semelhante a ansiedade gerado por substâncias com efeitos ansiogênicos, como a cafeína. Com isso, nossos resultados demonstraram através do teste de distribuição vertical eliciado pela novidade que o pré-tratamento com  $\alpha$ -tocoferol protegeu os animais frente ao comportamento tipo ansiedade induzida pelas doses de 1 mg/kg e 2 mg/kg de indometacina. Nos grupos pré-tratados com  $\alpha$ -tocoferol se observou um aumento do tempo de exploração do topo do aparato em comparação aos grupos tratados somente com indometacina, outros efeitos observados foram a diminuição de episódios de congelamento, este comportamento havia sido intensificado com a utilização da indometacina na dose de 1 mg/kg. Através desses resultados, demonstramos que a ação antioxidante do  $\alpha$ -tocoferol foi capaz de prevenir o efeito ansiogênico da indometacina nos parâmetros tempo no topo e congelamento. E diante disso, podemos inferir que a indometacina está induzindo um desbalanço redox, que está envolvido na indução da ansiedade. Alguns estudos relacionando a ansiedade e o estresse oxidativo tanto em animais quanto em humanos vêm sendo amplamente discutido na literatura. Segundo Maximino (2011), o comportamento tipo ansiedade em *zebrafish* é mediado por um desbalanço de espécies reativas do oxigênio e a oxidação da serotonina, esse estudo corrobora com nossos dados que demonstram que o tratamento com o antioxidante  $\alpha$ -tocoferol preveniu o comportamento tipo ansiedade induzido pela indometacina. Nossos dados corroboram

também com o que já foi descrito na literatura, onde a utilização de antioxidantes para o bloqueio do comportamento tipo ansiedade em alguns modelos animais foram demonstrados através do uso de flavonoides (GERMÁN-PONCIANO et al, 2020); vitamina C (PUTY et al., 2014); e vitamina E (DE CARVALHO et al., 2019).

Através dos nossos resultados comportamentais, onde observamos que a indometacina está modulando alterações relacionada ao comportamento tipo ansiedade, e que o pré-tratamento com  $\alpha$ -tocoferol foi capaz de prevenir tal comportamento, buscamos investigar se os danos a nível ansiogênico causada pela indometacina estava associado ao possível desbalanço redox, devido a alguns estudos relatarem que AINES promovem um aumento do estresse oxidativo através dos seu efeitos adversos (GOODWIN et al., 2013). Para isso, realizamos o ensaio de peroxidação lipídica no cérebro dos animais tratados com indometacina e/ou  $\alpha$ -tocoferol. Através dos dados obtidos, observamos que a indometacina promoveu um aumento dos níveis de MDA, que é um marcador de estresse oxidativo, no cérebro do *zebrafish* quando comparado ao grupo controle, por outro lado, os grupos pré-tratados com o  $\alpha$ -tocoferol demonstraram um efeito protetor frente a alteração oxidativa gerada pelo anti-inflamatório, onde os níveis de MDA foram similares ao grupo controle. Os dados obtidos pelo presente estudo, corroboram com outros estudos que observaram o possível efeito ansiolítico do  $\alpha$ -tocoferol em roedores submetidos a modulação ambiental, e que foram tratados apenas com este antioxidante em doses mais elevadas da utilizada no estudo (COMIN et al., 2010).

A utilização do tocoferol em pesquisas envolvendo alterações no sistema nervoso central se baseia na sua intensa capacidade antioxidante, permitindo que essa vitamina atue como um possível neuroprotetor frente a alterações comportamentais de psicopatologias, como depressão e ansiedade. A ação do  $\alpha$ -tocoferol na modulação dessas desordens é através do aumento de mecanismos de defesa antioxidantes (VATASSERY et al., 1999). Corroborando com estudos anteriores realizados por nosso grupo, onde o tratamento com  $\alpha$ -tocoferol atuou na proteção do comportamento tipo ansiedade e na diminuição do estresse oxidativo em cérebro de *zebrafish* (DE CARVALHO, 2019). Portanto, nossos resultados estão em consonância com estudos anteriores, demonstrando a proteção do  $\alpha$ -tocoferol frente ao aumento do comportamento tipo ansiedade e dos níveis de MDA gerados pelo tratamento com indometacina.

Wang e colaboradores (2000), demonstraram que o  $\alpha$ -tocoferol pode reduzir a peroxidação lipídica em diversos modelos, onde a ação desse antioxidante consiste na redução da peroxidação lipídica através da eliminação dos radicais peroxil de forma mais rápida do que eles podem reagir com outros lipídios ou proteínas. O efeito protetor do  $\alpha$ -tocoferol observado em nosso trabalho, corrobora com diversos estudos que demonstram marcadores de estresse oxidativos aumentados no cérebro, incluindo glutathiona peroxidase, superóxido dismutase e glutathiona S-transferase quando camundongos *nocaute* para o receptor SR-B1 (receptor *scavenger* classe B tipo 1) que está envolvido no transporte do  $\alpha$ -tocoferol (ASHRAF, 2008).

A relação indometacina e estresse oxidativo, pode ser um dos fatores envolvidos no transtorno de ansiedade. Alguns estudos já evidenciaram que AINEs produzem radicais livres, resultando na geração de espécies reativas de oxigênio, e conseqüentemente em estresse oxidativo (KENG et al., 2017; MOHAMED et al., 2017). Ahmad e colaboradores, apontaram que a indometacina diminuiu os níveis de glutathiona fígado, rim e tecidos cerebrais (Ahmad et al., 2018). Além da glutathiona, Sabiu e colaboradores (2016) reportaram que a administração de indometacina reduziu a atividade de SOD, resultando em ulceração gástrica. Esses efeitos estão envolvidos na alta toxicidade da indometacina, corroborando com os nossos dados de mortalidade da administração de indometacina em doses mais elevadas. Begum e colaboradores (2015), relataram que o status oxidante total e os conteúdos de MDA aumentaram significativamente e as atividades de CAT diminuíram significativamente após o tratamento com INDO em ratos albinos machos. Corroborando também com nossos achados, nos quais a administração de indometacina causou um aumento dos níveis de MDA no cérebro de *zebrafish*. Resultados semelhantes, porém, em tecidos gástricos, foram relatados por Boyacioglu e colaboradores, em que o nível de MDA foi aumentado em resposta à administração de indometacina por meio do estresse oxidativo em ratos.

Contudo, diante dos nossos resultados, demonstramos que o tratamento com  $\alpha$ -tocoferol isoladamente não apresentou diferenças nas análises comportamentais e neuroquímicas em comparação ao controle, no entanto diante da intensificação do comportamento tipo ansiedade e estresse oxidativo gerado pela indometacina o  $\alpha$ -tocoferol exerceu um efeito bloqueador. Com isso, a indometacina pode estar modulando o comportamento tipo ansiedade através do aumento de espécies reativas, no entanto ainda se faz necessário mais análises bioquímicas para se melhor compreender a relação da indometacina, que é um bloqueador não seletivo de COX,

com o comportamento tipo ansiedade, e como este anti-inflamatório interfere no desbalanço redox no cérebro.

## 6. CONCLUSÃO

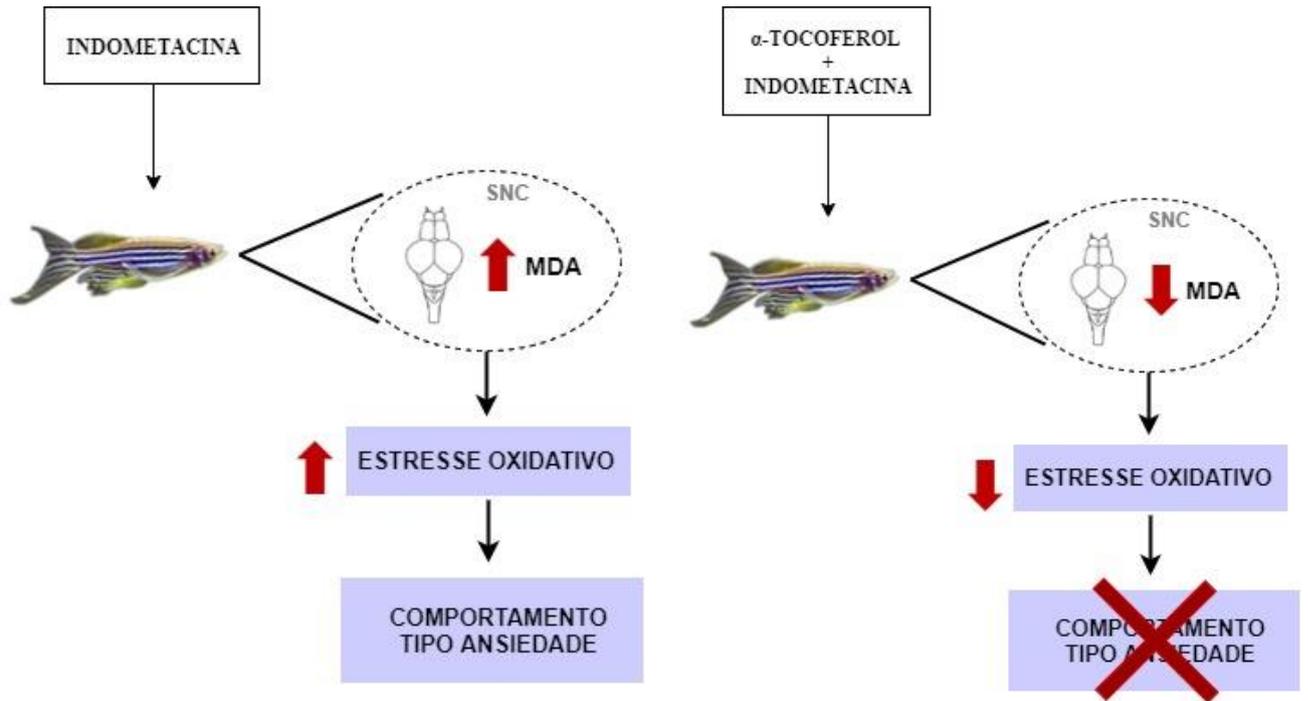
O comportamento tipo ansiedade foi intensificado pela administração do anti-inflamatório indometacina em *Danio rerio*.

A avaliação da curva dose resposta da indometacina no teste DVN mostrou que a dose de 3 mg/kg apresentou 100% de mortalidade dos animais.

O tratamento com indometacina aumentos os níveis de MDA no cérebro de *Danio rerio*, induzindo assim um aumento do estresse oxidativo.

O  $\alpha$ -tocoferol protegeu contra o efeito ansiogênico gerado pela indometacina no teste de distribuição vertical eliciada pela novidade, o tratamento com este antioxidante também diminuiu os níveis de MDA no cérebro de *zebrafish*, exercendo assim uma proteção frente a danos oxidativos gerados pela indometacina.

Portanto, como demonstrado através da figura 14 e das nossas análises sobre os efeitos do tratamento com indometacina e da sua associação com o antioxidante  $\alpha$ -tocoferol, observamos que indometacina está exercendo um aumento do comportamento tipo ansiedade e do aumento do estresse oxidativo, e que esses efeitos são protegidos com o pré-tratamento com o  $\alpha$ -tocoferol.



**Figura 15:** Esquema representativo do efeito da indometacina e do pré-tratamento com  $\alpha$ -tocoferol no cérebro de *zebrafish*.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADHIKARY, B.; YADAV, S. K.; BANDYOPADHYAY, S. K.; CHATTOPADHYAY, S. Epigallocatechin gallate accelerates healing of indomethacin-induced stomach ulcers in mice, **Pharmacology Reports**, v. 63, p. 527- 536, 2011.

ASHRAF, M. Z., KAR, N. S., CHEN, X., CHOI, J., SALOMON, R. G. Specific oxidized phospholipids inhibit scavenger receptor bi-mediated selective uptake of cholesteryl esters. **J. Biological Chemistry**, v. 283, p. 10408–10414, 2008.

BASIVIREDDY, A.; VASUDEVAN, M.; JACOB, K.A. Balasubramanian, Indomethacin-induced mitochondrial dysfunction and oxidative stress in villus enterocytes. **Biochemical Pharmacology**, v. 64, n. 2, p. 339–349, 2002.

BASIVIREDDY, J.; JACOB, M.; RAMAMOORTHY, P. PULIMOOD, A.B.; BALASUBRAMANIAN, K.A. Indomethacin-induced free radical-mediated changes in the intestinal brush border membranes. **Biochemical. Pharmacology**, v. 65, n. 4, p. 683–695, 2003.

BATLOUNI, M. Anti-inflamatórios não esteroides: Efeitos cardiovasculares, cérebro vasculares e renais. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 94, n. 4, p. 556-563, 2010.

BERCIK, P.I.; VERDU, E.F; FOSTER, J.A.; MACRI, J.; POTTER, M.; HUANG, X.; ALINOWSKI, M P.; JACKSON, W.; BLENNERHASSETT, P.; NEUFELD, K.A.; LU, J.; KHAN, W.I.; CORTHESEY-THEULAZ, I.; CHERBUT, C. COLLINS, S.M. Chronic gastrointestinal inflammation induces anxiety-like behavior and alters central nervous system biochemistry in mice. **Gastroenterology**, p. 2102-2112, 2010.

BIANCHI, M.L.P.; ANTUNES, L.M.G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**, v. 12, n. 12, p. 123-30, 1999.

BOTTING RM. Inhibitors of cyclooxygenase: Mechanism, selectivity and uses. **Journal of Physiology and Pharmacology**. v. 57, n. 5, p. 113-24, 2006.

BOUAYED, J.; RAMMAL, H.; SOULIMANI, R. Oxidative stress and anxiety: relationship and cellular pathways. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2, p. 63-67, 2009.

BRENOL, J.C.T.; XAVIER, R. M.; MARASCA, J. Antiinflamatórios não hormonais (AINHs) convencionais. **Revista Brasileira de Medicina**, v. 57, p. 1-12, 2000.

BRITISH National Formulary– BNF 57. **London: British Medical Association and The Royal Pharmaceutical Society of Great Britain**, 2009.

BULLER, KM.; XU, Y.; DAY, T. Indomethacin attenuates oxytocin and hypothalamic-pituitary-adrenal axis responses to systemic interleukin-1 beta. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 10, p. 519–528, 1998.

CARRASCO-POZO, C.; CASTILHO, R.L.; BELTRÁN, C; MIRANDA, A.; FUENTES, J.; GOTTELAND, M. Gotteland, Molecular mechanisms of gastrointestinal protection by quercetin against indomethacin-induced damage: role of NF- $\kappa$ B and Nrf2. **Journal of Nutrition Biochemistry**, v. 27, p. 289–298, 2015.

CARVALHO, T.S. **A intensificação do comportamento tipo ansiedade por cafeína em Danio rerio (zebrafish) é prevenida pelo tratamento com  $\alpha$ -tocoferol e L-NAME.** 105 f. Dissertação (Mestrado em Neurociências e Biologia Celular), Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Pará, 2014.

CATANIA, A. S.; BARROS, C. R.; FERREIRA, S. R. G. Vitaminas e minerais com propriedades antioxidantes e risco cardiometabólico; Controvérsias e perspectivas. **Artigo de revisão. Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, 2009.

CHAHADE, Wiliam Habib; GIORGI, Rina Dalva Neubarth; SZAJUBOK, José Carlos Mansur. Antiinflamatórios não hormonais. **Einstein**, v. 6, n. 1, p. 166-174, 2008.

CHEN, Z.; GIBSON, T. B; ROBINSON, F. MAP kinases. **Chemical Reviews**, v. 101, n. 8, pp. 2449–2476, 2001.

CHOLERIS, E. et al. A detailed ethological analysis of the mouse open field test: effects of diazepam, chlordiazepoxide and an extremely low frequency pulsed magnetic field. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 25, n. 3, 235–260, 2001.

COMIN, D.; GAZARINI, L.; ZANONI, J.N.; MILANI, H.; DE OLIVEIRA, R.M.W. Vitamin E improves learning performance and changes the expression of nitric oxide-producing neurons in the brain of diabetic rats. **Behavioural Brain Research**, 2010.

COOPER, A. D. Hepatic uptake of chylomicron remnants. **Journal of Lipid Research**, 1997.

CRASKE, M.G.; RAUCH, S.L.; URSANO, R.; PRENOVEAU, J.; PINE, D.S.; ZINBARG, R.E. What is an anxiety disorder? **Depression and Anxiety**, 26: 1066–85, 2009.

CRYER, B.; FELDMAN, M. Cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase2 selectivity of widely used nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Am J Med*, v. 104, p. 413-21, 1998.

DANNHARDT, G.; KIEFER, W. Cyclooxygenase inhibitors—current status and future prospects. **European Journal of Medicine Chemistry**, v. 36, p. 109–126, 2001.

DE CARVALHO, T.S.; CARDOSO, P.B.; Santos-Silva, M.; Lima-Bastos, S.; LUZ, W.L.; ASSAD, N.; KAUFFMANN, N.; PASSOS, A.; BRASIL, A.; BAHIA, C.P.; MORAES, S.; GOUVEIA, A.; BATISTA, E.J.; OLIVEIRA, K.R.M.H.; HERCULANO, A.M. Oxidative Stress Mediates Anxiety-Like Behavior Induced by High Caffeine Intake in Zebrafish: Protective Effect of Alpha-Tocopherol. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, 2019.

DE OLIVEIRA, M. R. et al. Oxidative stress in the hippocampus, anxiety-like behavior and decreased locomotory and exploratory activity of adult rats: effects of subacute vitamin A supplementation at therapeutic doses. **Neurotoxicology**, v. 28, n. 6, p. 1191–1199, nov. 2007.

DHINGRA, M.S.; DHINGRA, D.; KUMRIA, R.; CHADHA, R.; SINGH, T.; KUMAR, A.; KARAN, M. Effect of trimethylgallic acid esters against chronic stress-induced anxiety-like behavior and oxidative stress in mice. **Pharmacology Reports**, v. 66, n. 4, p. 606–12, 2014.

EGAN, R. J.; et al. Understanding behavioral and psychological phenotypes of stress and anxiety in zebrafish. *Behavior Brain Research*. 2009.

EGGERMONT, E. Recent advances in vitamin E metabolism and deficiency. **Europe Journal of Pediatrics**, v. 165, p. 429-434, 2006.

FAROOQ, N.; PRIYAMVADA, S.; KHAN, F.; YUSUFI, A.N.K. Time dependent effect of gentamicin on enzymes of carbohydrate metabolism and terminal digestion in rat intestine. **Human & Experimental Toxicology**, v. 26, n. 7, p. 587–593, 2007.

FERREIRA A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 43, n. 1, p. 61-8, 1997.

FILARETOVA, L. P.; PODVIGINA, T. T.; BAGAEVA, T. R.; BOBRY SHEV, P. I. U. Compensatory gastroprotective role of glucocorticoid hormones. *Rossiiskii. Fiziologicheskii zhurnal imeni I.M. Sechenova*, v. 93, n. 11, p. 1217-1228, 2007.

FITZPATRICK, F.A. Cyclooxygenase enzymes: regulation and function. **Current Pharmaceutical Design**, v. 10, n. 6, p. 577–588, 2004.

FRANCO, G. **Tabela de composição química de alimentos**. 9ªed. Atheneu. 2008.

GALLAGHER, M. L.; MAHAN, L. K.; ESCOTT-STRUMP, S.; RAYMOND, J. L. **Krause: Alimentos, Nutrição e Dietoterapia**, ed. 13, p. 1358, 2013.

GIASSON, B. I.; DUDA, J.E.I.; MURRAY, V. J. Oxidative damage linked to neurodegeneration by selective  $\alpha$ -synuclein nitration in synucleinopathy lesions. **Science**, v. 290, n. 5493, p 985–989, 2000.

GRAEFF, F.G.; ZANGROSSI, H. Animal models of anxiety disorders. In: D’haenen, H.; Den Boer, J.A.; Westenber, H.; Willner, P. (eds.). **Textbook of biological psychiatry**, p. 879-893, 2002.

GRASES, G.; COLOM, M.A.; FERNANDEZ, R.A.; COSTA-BAUZA, A.; GRASES, F. Evidence of Higher Oxidative Status in Depression and Anxiety. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, 2014.

GREEN, K, BRAND, M.D, MURPHY, M.P. Prevention of mitochondrial oxidative damage as a therapeutic strategy in diabetes. **Diabetes**, v. 53(Suppl 1), p. 110-8, 2006.

GRIFFIN, M.R; YARED, A.; RAY W.A. Nonsteroidal antiinflammatory drugs and acute renal failure in elderly persons. **American Journal of Epidemiology**, v.151, p. 488–96, 2000.

GRILO, E. C.; COSTA, P. N.; GURGEL, C. S. S.; BESERRA, A. F. L.; ALMEIDA, F. N. S.; DIMENSTEIN, R. Alpha-tocopherol and gamma-tocopherol concentration in vegetable oils. **Food Science and Technology (Campinas)**, v. 34, n.2, 2014.

HACQUEBARD, M.; CARPENTIER, Y. A. Vitamin E: absorption, plasma transport and cell uptake. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, 2005.

HALLIWELL, B. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? **Journal Neurochemistry**, v. 97, n. 6, 1634-58, 2006.

HASSAN, W. Association of Oxidative Stress to the Genesis of Anxiety: Implications for Possible Therapeutic Interventions. **Current Neuropharmacology**, v. 12, n. 2, p. 120–139, mar. 2014.

HAWKEY, C. J.; SKELLY, M. M. Gastrointestinal safety of selective COX-2 inhibitors. **Current Pharmaceutical Design**, v. 8, p. 1077-1089, 2002.

HE, J.; WHELTON, P.K.; VU, B. Aspirin and risk of hemorrhagic stroke: a meta-analysis of randomized controlled trials. **Journal of the American Medical Association**, v. 280, p. 1930–5, 1998.

HERCULANO, A. M.; MORATOC, S.; GOUVEIA JR, A. Measuring anxiety in zebrafish: A critical review. **Behavioral Brain Research**, 2010.

HERRERA, E.; BARBAS, C. Vitamin E: action, metabolism and perspectives. **Journal of Physiology and Biochemistry**, v. 57, n. 2, 2001.

HO, N. et al. Indomethacin Reverses Decreased Hippocampal Cell Proliferation in Streptozotocin-Induced Diabetic Mice. **Metabolic Brain Disease**, v. 22, n. 2, p.134-139, 2015.

HOWARD, P.A. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and cardiovascular Risk. **Journal of American College of Cardiology**, v. 43, p.519-25, 2004.

INOUE, A.; MURANAKA, S.; FUJITA, H. Molecular mechanism of diclofenac-induced apoptosis of promyelocytic leukemia: Dependency on reactive oxygen species, Akt, Bid, cytochrome and caspase pathway. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 37, p. 1290–1299, 2004.

INSEL, P.A. Analgesic-antipyretic and antiinflammatory agents and drugs employed in the treatment of gout. In: Hardman JG, Gilman AG, Limbird LE. Goodman & Gilman's. The pharmacological basis of therapeutics. 11<sup>th</sup> ed. New York: McGraw-Hill, p. 2021, 2005.

JANGRA, A.; LUKHI, M.M.; SULAKHIYA, K.; BARUAH, C.C; LAHKAR, M. Protective effect of mangiferin against lipopolysaccharide-induced depressive and anxiety-like behaviour in mice. **Europe Journal of Pharmacology**, v.740, p. 337-345, 2014.

JEAN-CLAUDE, A.; MARSHALL, B. F.; FERNANDES, SEBASTIAN DI CESARE; SHAWN, C. MALONEY, PATRICK, T.; LOGAN, EMILIA ANTECKA, MIGUEL N.; BURNIER, JR. The use of a cyclooxygenase-2 inhibitor

(Nepafenac) in an ocular and metastatic animal model of uveal melanoma. **Carcinogenesis**, v. 28, n. 9, p. 2053–2058, 2007.

KALLUEF, A.V. Neurobiology of memory and anxiety: from genes to behavior. **Neural Plasticity**, v. 2007, p.12, 2007.

KHAN, S.; YUSUFIB, F.N.K.; YUSUFIA, A.N.K. Comparative effect of indomethacin (IndoM) on the enzymes of carbohydrate metabolism, brush border membrane and oxidative stress in the kidney, small intestine and liver of rats. **Toxicology Reports**, p. 389-394, 2019.

KOROLKOVAS, A. Dicionário Terapêutico Guanabara. Rio de Janeiro, Editora Guanabara Koogan, Edição 2013/2014.

KULOGLU, M.; ATMACA, M.; TEZCAN. E.; GECICI, O.; USTUNDAG, B.; BULUT, S. Antioxidant enzyme and malondialdehyde levels in patients with panic disorder. **Neuropsychobiology**, v. 46, p. 186-9, 2002.

KULOGLU, M.; ATMACA, M.; TEZCAN. E.; GECICI, O.; USTUNDAG, B.; BULUT, S.; TUNCKOL, H. Antioxidant enzyme activities and malondialdehyde levels in patients with obsessive-compulsive disorder. **Neuropsychobiology**, v. 46, p.27-32, 2002.

LAINE, L.; KIVITZ, A.J.; BELLO, A.E.; GRAHN, A.Y.; SCHIFF, M.H.; TAHA, A.S. Double-blind randomized trials of single-tablet ibuprofen/high-dose famotidine vs. Ibuprofen alone for reduction of gastric and duodenal ulcers. **The American Journal of Gastroenterology**, 2012.

LEVIN, E.D.; BENCAN, Z.; CERUTTI, D.T. Anxiolytic effects of nicotine in zebrafish. **Physiology and Behavior**, v. 90, p. 54–58, 2007.

LI, H.; HORTMANN, M.; DAIBER, A.; OELZE, M.; OSTAD, M.A.; SCHWARZ, P.M. Cyclooxygenase 2-Selective and Nonselective Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs Induce Oxidative Stress by Up-Regulating Vascular NADPH Oxidases. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 326, n.3, 745-53, 2008.

LIU, J.Y.; WU, C.C.; CHEN, B.R. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs induced endothelial apoptosis by perturbing peroxisome proliferator activated receptor- $\delta$  transcriptional pathway. **Molecular pharmacology**, v. 74, p. 1399–1406, 2008.

LV, P., LUO, HE-SHENG; ZHOU, XIAO-PING; PAUL, S. C.; XIAO, YAN-JV; SI, XIN-MIN; LIU, SHI-QUAN. Thalidomide prevents rat liver cirrhosis via inhibition of oxidative stress. **Pathology-Research and Practice**, v. 202, p.777-788, 2006.

MELLO, B.S.; MONTE, A.S.; MCINTYRE, R.S.; SOCZYNSKA, J.K.; CUSTODIO, C.S.; CORDEIRO, R.C.; CHAVES, J.H.; VASCONCELOS, S.M.; NOBRE, H.V.; FLORENCO DE SOUSA, JR. HYPHANTIS, F.C.; CARVALHO, T.N. A.F.; MACEDO, D.S Effects of doxycycline on depressivelike behavior in mice after lipopolysaccharide (LPS) administration. **Journal of Psychiatric Research**, v. 47, p. 1521-1529, 2013.

MELLO, B.S.; MONTE, A.S.; MCINTYRE, R.S.; SOCZYNSKA, J.K.; CUSTODIO, C.S.; CORDEIRO, R.C.; CHAVES, J.H.; VASCONCELOS, S.M.; NOBRE, JR., H.V.; FLORENCO

DE SOUSA, F.C.; HYPHANTIS, T.N.; CARVALHO, A.F.; MACEDO, D.S. Effects of doxycycline on depressivelike behavior in mice after lipopolysaccharide (LPS) administration. **Journal of Psychiatric Research**, v. 47, p. 1521-1529, 2013.

MENDES, R. T; STANCZYK, C. P; SORDI, R; OTUKI, M. F; SANTOS, F. A. dos; FERNANDES, D. Inibição seletiva da ciclo-oxigenase-2: riscos e benefícios. **Revista Brasileira De Reumatologia**, 2012.

MOHAMED, S.; UPRETI, S.; RAJENDRA, S.; DANG, R. Genotoxicity: Mechanism, Testing Guidelines and Methods. **Global Journal of Pharmacology & Pharmaceutical Science**, v. 1, n. 5, p. 133-138, 2017.

MONJE, M.L.; TODA, H.; PALMER, T.D. Inflammatory blockade restores adult hippocampal neurogenesis. **Science**, v. 302, p.1760–5, 2003.

MONTEIRO, E.C.A. et al. Os antiinflamatórios não esteroidais (AINEs). **Temas de Reumatologia Clínica**, v.9, n.2, p.53-63, 2008.

MURI, E. M. F; SPOSITO, M. M. de M; METSAVAHT, L. Anti-inflamatórios não esteroidais e sua farmacologia local. **Acta Fisiátrica**, 2009.

NAGAHARA, N.; NAGANO, M.; ITO, T.; SHIMAMURA, K.; AKIMOTO, T.; SUZUKI, H. Antioxidant enzyme, 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase-knockout mice exhibit increased anxiety-like behaviors: a model for human mercaptolactate-cysteine disulfiduria. **Scientific Reports**, 2013.

NAITO, Y.; YOSHIKAWA, T.; YOSHIDA, N.; KONDO, M. Role of oxygen radical and lipid peroxidation in indomethacin-induced gastric mucosal injury. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 43, n.9, suppl., p. 30S-34S, 1998.

NAKAMURA, Y.K.; OMAJE, S.T. Alpha-tocopherol modulates human umbilical vein endothelial cell expression of Cu/Zn superoxide dismutase and catalase and lipid peroxidation. **Nutrition Research**, v. 28, p. 671–680, 2008.

NG, L.-T.; KO, H.-J. Comparative effects of tocotrienol-rich fraction,  $\alpha$ -tocopherol and  $\alpha$ -tocopheryl acetate on inflammatory mediators and nuclear factor kappa B expression in mouse peritoneal macrophages. **Food Chemistry**, v. 134, p. 920–925, 2012.

NYSKA, A.; KOHEN, R. Oxidation of biological systems: Oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. **Toxicologic Pathology**, v. 6, p. 620-650, 2002.

OSAKADA, F.; Neuroprotective effects of  $\alpha$ -tocopherolon oxidative stress rat striatal cultures. **Europe Journal of Pharmacology**, v. 465, p. 15-22, 2003.

PANCOTE, C.G. Planejamento, síntese e avaliação biológica de derivados pirrólicos com potencial atividade anti-inflamatória. **Universidade de São Paulo Faculdade de Ciências Farmacêuticas**, 2009.

PAREPALLY, J.M.R; MANDULA, H.; SMITH, Q.R. Brain uptake of nonsteroidal anti-inflammatory drugs: Ibuprofen, flurbiprofen, and indomethacin. **Pharmaceutical Research**, v. 23, n. 5, p. 873-881, 2006.

QUILES, J. L.; HUERTAS, J. R.; BATINO, M.; MATAIX, J.; RAMÍREZ-TORTOSA M. C. Antioxidants Nutrients and Adryamicin Toxicity. **Toxicology**. v. 180, p.79-95, 2002.

REED, S. Nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced duodenal ulceration and perforation in a mature rottweiler. **Canadian Veterinary Journal**, v.43, p. 917-972, 2002.

ROSEMBERG, D.B.; BRAGA, M.M.; RICO, E.P.; LOSS, C.M.; CORDOVA, S.D.; MUSSULINI, B.H. Behavioral effects of taurine pretreatment in zebrafish acutely exposed to ethanol. **Neuropharmacology**, v. 63, p. 613–623, 2012.

ROSS, A. C.; CABALLERO, B.; COUSINS, R. J.; TUCKER, K. L.; ZIEGLER, T. R. **Modern Nutrition in Health and Disease**. 11. Ed. Philadelphia: Wolters Kluwer Health: Lippincott Williams and Wilkins, 2014.

ROTHWELL, N.J. Annual review prize lecture: cytokines-killers in the brain? **Journal of Physiology**, v.514, p. 3–17, 1999.

SABIU, S.; GARUBA, T.; SUNMONU, T.; AJANI, E.; SULYMAN, A.; NURAIN, I.; BALOGUN, A. Indomethacin-induced gastric ulceration in rats: Protective roles of *Spondias mombin* and *Ficus exasperate*. **Toxicology Reports**, v. 54, n. 1, p. 180, 2016.

SCHIEBER, M.; CHANDEL, N. S. ROS function in redox signaling and oxidative stress. **Current Biology**, v. 24, n. 10, p. R453–R462, 2014.

SCHIMMER, B.P.; PARKER, K.L. Adrenocorticotrophic hormone: Adrenocortical steroids and their synthetic analogs; Inhibitors of the synthesis and actions of adrenocortical hormone. **In: HARDMAN, J. G.; LIMBIRD, L.E; GILMAN, A. G. (Ed) Goodman e Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics**. v. 10, Cap. 60, p. 1649-1678, 2001.

SCHNEIDER, C. Chemistry and biology of vitamin E. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 49, p. 7-30. 2005.

SHAMI, N.J.I.E.; MOREIRA, E.A.M. Licopeno como agente antioxidante. **Revista de Nutrição**, v. 17, n. 2, p. 227-36, 2004.

SILVA, M. Avaliação do efeito da talidomita sobre os danos intestinais e hepáticos induzidos pela indometacina em ratos wistar. **Dissertação de mestrado**, 2011.

SINGH, J.A.; SAAG, K.G.; BRIDGES, S.L. 2015 American College of Rheumatology guideline for the treatment of rheumatoid arthritis. **Arthritis and Rheumatology**, v. 68, p. 1–26, 2016.

SOMASUNDARAM S, RAFI S, HAYLLAR J, SIGTHORSSON G, JACOB M, PRICE AB, MACPHERSON A, MAHMUD T, SCOTT D, WRIGGLESWORTH JM, BJARNASON I. Mitochondrial damage: a possible mechanism of the “topical” phase of NSAID induced injury to the rat intestine. *Gut* v. 41, p. 344–353, 1997.

SOSTRES, C.; GARGALLO, C.J.; LANAS, A. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and upper and lower gastrointestinal mucosal damage. **Arthritis Research & Therapy**, v. 15, suppl. 3, 2013.

STEINMEYER J: Pharmacological basis for the therapy of pain and inflammation with nonsteroidal anti-inflammatory drugs. **Arthritis Research**, v. 2, p. 379–385, 2000.

STEWART, A.M.; BRAUBACH, O.; SPITSBERGEN, J.; GERLAI, R.; KALUEFF, A.V. Zebrafish models for translational neuroscience research: from tank to bedside. **Trends in Neurosciences**, v. 37, p. 264–278, 2014.

STOCKER, A.; AZZI, A. Tocopherol-binding proteins: their function and physiological significance. **Antioxidant Redox Signal**, v. 2, p. 397-404, 2000.

SULAKHIYA, K.; KUMAR, P.; JANGRA, A.; DWIVEDI, S.; HAZARIKA, N.K.; BARUAH, C.C.; LAHKAR, M. Honokiol abrogates lipopolysaccharide-induced depressive like behavior by impeding neuroinflammation and oxido-nitrosative stress in mice. **Europe Journal of Pharmacology**, v. 744, p. 124-131, 2014.

TARBALI, S.; KHEZRI, S. Protective Effects of Vitamin D3 on Anxiety-like Behavior and the Total Antioxidant Power Following the Local Injection of Lysophosphatidylcholine in the Adult Rat Dorsal Hippocampus. **Journal of Neurological Sciences-Turkish**, v. 32, n.3, p. 482–493, 2015.

TRABER, M. G.; MANOR, D. Vitamin E. **American Society for Nutrition. Adv. Nutr**, v. 3, 2012.

UEMURA, M.; MANABE, H.; YOSHIDA, N.; FUJITA, N.; OCHIAI, J.; MATSUMOTO, N.; TAKAGI, T. NAITO, YOSHIKAWA, Y.T. Alpha-tocopherol prevents apoptosis of vascular endothelial cells via a mechanism exceeding that of mere antioxidation. **Europe Journal Pharmacology**, v. 456, p. 29–37, 2007.

VEJUX, A.; GUYOT, S.; MONTANGE, T.; RIEDINGER, J.-M.; KAHN, E.; LIZARD, G. Phospholipidosis and down-regulation of the PI3-K/PDK-1/Akt signalling pathway are vitamin E inhibitable events associated with 7-ketocholesterol-induced apoptosis. **Journal of Nutrition Biochemistry**, v. 20, p. 45–61, 2009.

VIGNET, C.; BEGOUT, M.L.; PEAN, S.; LYPHOUT, L.; LEGUAY, D.; COUSIN, X. Systematic screening of behavioral responses in two zebrafish strains. **Zebrafish**, v. 10, p. 365–375, 2013.

VOLLERT, C.; ZAGAAR, M.; HOVATTA, I.; TANEJA, M.; VU, A.; DAO, A.; LEVINE, A.; ALKADHI, K.; SALIM, S. Exercise prevents sleep deprivation-associated anxiety-like behavior in rats: potential role of oxidative stress mechanisms. **Behavioural Brain Research**, v. 224, n. 2, p. 233–40, 2011.

WALLERT, M. SCHMÖLZ, L. GALLI, F.; BIRRINGER, M.; LORKOWSKI, S. Regulatory metabolites of vitamin E and their putative relevance for atherogenesis. **Redox Biology**, v. 2, p. 495–503, 2014.

WANNAMACHER, L.; FERREIRA, M.B. Antiinflamatórios esteróides. In: FUCHS, F.D.; WANNAMACHER, L. (Ed.). **Farmacologia Clínica Fundamentos da Terapêutica Racional**, v. 3, 2004b. c. 23, p. 296-305. 2004.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO Model Formulary. Geneva, 2008.

YANG, C. S., LUO, P., ZENG, Z., WANG, H., MALAFA, M., SUH, N. Vitamin E and cancer prevention: Studies with different forms of tocopherols and tocotrienols. **Molecular Carcinogenesis**, 2020.

YANG, L.; SHI, L-J.; YU, J.; ZHANG, Y-Q. Activation of protein kinase A in the amygdala modulates anxiety-like behaviors in social defeat exposed mice. **Molecular Brain**, v.9, n. 3, 2016.

YANG, L.; XIAN, D.; XIONG, X.; LAI, R.; SONG, J.; ZHONG, J. Proanthocyanidins against Oxidative Stress: From Molecular Mechanisms to Clinical Applications. **BioMed Reseach. Internacional**, v. 2018, p. 1–11, 2018.

YEUNG, D. L.; LAQUATRA, I. **Heinz Handbook of Nutrition**. 9. ed. H.J. Heinz Company, p. 80-83, 2003.



## 8. ANEXOS

### ANEXO A – PARECER COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA COM ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO



#### **PARECER 213-14**

**Projeto:** O uso de Paulistinha (Danio rerio) como Modelo de Neurofarmacologia

**Coordenador:** Anderson Manoel Herculano Oliveira da Silva

**Área Temática:** Neurociências

**Vigência:** 05/2014 a 05/2018

**Nº no CEPAE-UFGA:** 213-14

O projeto acima identificado foi avaliado pelo Comitê de Ética Em Pesquisa Com Animais de Experimentação da Universidade Federal do Pará (CEPAE). O tema eleito para a investigação é de alto teor científico justificando a utilização do modelo animal proposto. Os procedimentos experimentais utilizados seguem as normas locais e internacionais para tratamento e manipulação de animais de experimentação. Portanto, o CEPAE, através de seu presidente, no uso das atribuições delegadas pela portaria Nº 1032/2014 do Reitor da Universidade Federal do Pará, resolve **APROVAR** a utilização de animais de experimentação (N= 120, Zebrafish) nas atividades do projeto em questão, no período de vigência estabelecido.

As atividades experimentais fora do período de vigência devem receber nova autorização deste comitê.

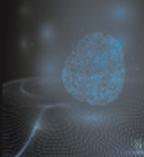
Belém, 02 de maio de 2014

  
Prof. Dr. Wallace Gomes Leal  
Presidente do CEPAE-UFGA

## ANEXO B – RESUMO APRESENTADO NA XLI REUNIÃO DA SBNeC 2018



**XLI REUNIÃO ANUAL DA SBNeC**  
SOCIEDADE BRASILEIRA DE NEUROCIÊNCIAS E COMPORTAMENTO

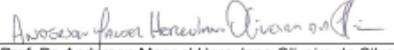


Certificado

Certificamos que

O resumo O TRATAMENTO COM INDOMETACINA PREVINE COMPORTAMENTO TIPO ANSIEDADE INDUZIDO PELO ESTRESSE AGUDO DE CONTENÇÃO, de autoria de JESSICA PINHEIRO, WALDO LUCAS LUZ, NADYME ASSAD, PATRICK CARDOSO, MATEUS SANTOS, EMERSON FEIO, TAYANA SILVA DE CARVALHO, EVANDER OLIVEIRA BATISTA, SUELLEN MORAIS, ADELAIDE CONCEIÇÃO PASSOS, ROSIVALDO BORGES, KAREN RENATA OLIVEIRA, ANDERSON MANOEL HERCULANO foi apresentado na forma de painel durante a

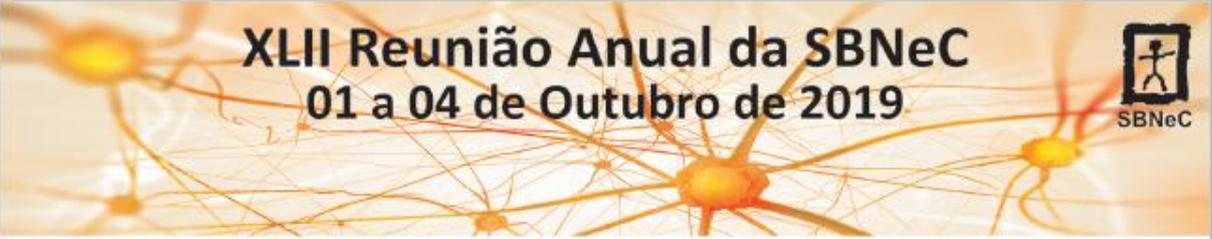
XLI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento - SBNeC, realizada no período de 22 a 25 de agosto de 2018, no Mendes Convention Center, em Santos, SP.

  
Prof. Dr. Anderson Manoel Herculano Oliveira da Silva  
Presidente da SBNeC

---



## ANEXO C – RESUMO APRESENTADO NA XLII REUNIÃO DA SBNeC 2019

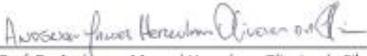


**XLII Reunião Anual da SBNeC**  
**01 a 04 de Outubro de 2019**



**Certificado**

Certificamos que o trabalho **A INDOMETACINA ENVOLVIDA NO COMPORTAMENTO TIPO ANSIEDADE**, de autoria de **JESSICA SOUZA PINHEIRO, NADYME ASSAD HOLANDA DA SILVA, EVANDER OLIVEIRA BATISTA, SUELLEN MORAES, ADELAIDE PASSOS, KAREN RENATA OLIVEIRA, ANDERSON MANOEL HERCULANO** foi apresentado na forma de POSTER E PRÊMIO JAR na **XLII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento - SBNeC**, realizada no período de 01 a 04 de outubro de 2019, no Campos do Jordão Convention Center, em Campos do Jordão, SP.

  
Prof. Dr. Anderson Manoel Herculano Oliveira da Silva  
Presidente da SBNeC



## ANEXO C – RESUMO APRESENTADO NA XLII REUNIÃO DA SBNeC 2020

19/11/2020

[https://sbnec.rpgestor.com/associado/associado\\_acesso/certificado/cod/9c882d5c6a1aa240b2672dce0ffb03360abcaca5/disabled...](https://sbnec.rpgestor.com/associado/associado_acesso/certificado/cod/9c882d5c6a1aa240b2672dce0ffb03360abcaca5/disabled...)**XLIII Reunião Anual da SBNeC**

13 a 17 de outubro de 2020  
Evento Online

**Certificado****SBNeC**Sociedade Brasileira de  
Neurociências e Comportamento

Certificamos que

**JESSICA SOUZA PINHEIRO** apresentou o trabalho **INDOMETHACIN INDUCES ANXIETY-LIKE BEHAVIOR AND OXIDATIVE STRESS IN ZEBRAFISH BRAIN** Jessica Pinheiro<sup>1</sup>; Nadyme Assad<sup>1</sup>; Luana Ketlen Reis Leão<sup>1</sup>; Evander Oliveira Batista<sup>1,2</sup>; Suellen Morais<sup>1</sup>; Adelaide Passos<sup>1</sup>; Karen Renata Oliveira<sup>1</sup>; Anderson Manoel Herculano<sup>1</sup>. Universidade Federal do Pará

na forma de vídeo poster na XLIII Reunião Anual da Sociedade de Neurociências e Comportamento – SBNeC 2020 - Online, de 13 a 17 de outubro de 2020, no formato virtual.

Prof. Dr. Anderson Manoel Herculano Oliveira da Silva  
Presidente da SBNeC

Apoio Financeiro



Patrocinadores

