



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE MEDICINA
Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas

**PROPRIEDADES TERAPÊUTICAS DA *MELISSA OFFICINALIS* COMO
ALTERNATIVA NATURAL PARA DISFUNÇÕES NEUROLÓGICAS**

JOÃO EUDES FILHO

BRASÍLIA-DF
2014

JOÃO EUDES FILHO

**PROPRIEDADES TERAPÊUTICAS DA *MELISSA OFFICINALIS* COMO
ALTERNATIVA NATURAL PARA DISFUNÇÕES NEUROLÓGICAS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, da Faculdade de Medicina, da Universidade de Brasília, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Aplicadas em Saúde.

Orientadora: Profa. Dra. Vânia Ferreira

BRASÍLIA-DF

2014

JOÃO EUDES FILHO

**PROPRIEDADES TERAPÊUTICAS DA *MELISSA OFFICINALIS* COMO
ALTERNATIVA NATURAL PARA DISFUNÇÕES NEUROLÓGICAS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Aplicadas em Saúde.

Aprovada em 07 de Março de 2014

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Vania Moraes Ferreira
(Presidente)
Universidade de Brasília

Profa. Dra. Cristiane do Socorro Ferraz Maia
(Membro titular externo)
Universidade Federal do Pará

Profa. Dra. Eliza Carla Barroso Duarte Veríssimo
(Membro titular interno)
Universidade de Brasília

Profa. Dra. Vaneila Ferreira Martins
(Membro suplente)
Universidade Federal de Goiás

BRASÍLIA-DF

2014

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Ilustração da <i>Melissa officinalis</i>	19
Figura 2 – Principais mediadores inflamatórios da sepse	22
Figura 3 – Etapas do processo do ciclo do mercúrio e metilmercúrio	23
Figura 4 – Procedimentos cirúrgicos	33
Figura 5 – Teste do Campo aberto	34
Figura 6 – Teste do Labirinto em cruz elevado	35
Figura 7 – Teste do Nado forçado	37
Figura 8 – Teste da Esquiva inibitória do tipo <i>step-down</i>	38
Figura 9 – Delineamento dos procedimentos experimentais	40
Figura 10 – <i>M. officinalis</i> x locomoção de ratos sobreviventes à sepse	42
Figura 11 – <i>M. officinalis</i> x ansiedade de ratos sobreviventes à sepse	43
Figura 12 – <i>M. officinalis</i> x depressão de ratos sobreviventes à sepse	44
Figura 13 – <i>M. officinalis</i> x memória de ratos sobreviventes a sepse.....	45
Figura 14 – <i>M. officinalis</i> x locomoção de ratos expostos ao MeHg	46
Figura 15 – <i>M. officinalis</i> x ansiedade de ratos expostos ao MeHg.....	47
Figura 16 – <i>M. officinalis</i> x depressão de ratos expostos ao MeHg.....	48
Figura 17 – <i>M. officinalis</i> x memória de ratos expostos ao MeHg	49

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA.....	Análise de variância
CEUA.....	Comitê de Ética no Uso Animal
CLPC.....	Cirurgia de ligadura de perfuração cecal
DA.....	Doença de Alzheimer
DZP.....	Diazepam
EBA.....	Entradas nos braços abertos
EBF.....	Entradas nos braços fechados
FXT.....	Fluoxetina
i.p.....	Via intraperitoneal
LCE.....	Labirinto em cruz elevado
MCD.....	Memória de curta duração
MeHg.....	Metilmercúrio
MLD.....	Memória de longa duração
OF.....	Operação fictícia
SNC.....	Sistema Nervoso Central
SRIS.....	Síndrome da resposta inflamatória sistêmica
TBA.....	Tempo nos braços abertos
TBF.....	Tempo nos braços fechados
UTI.....	Unidade de terapia intensiva

Dedico este trabalho aos meus pais Eudes Pinto de Souza (in memoriam) e Almerinda Valério Lopes, à minha esposa e companheira Carla Carlos dos Santos e aos meus filhos Arthur Carlos Eudes, Filipe Carlos Eudes e Henrique Carlos Eudes.

AGRADECIMENTOS

- A Deus, o Todo Poderoso, pela saúde e disposição para eu chegar até aqui.
- A minha família, pela compreensão nos momentos de ausência.
- A Profa. Vânia Ferreira pelo cuidado especial comigo, me estimulando e orientando em todos os momentos e etapas que se fizeram necessários para eu conseguir este tão almejado Mestrado.
- Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas e a todos os professores que compõe o corpo acadêmico, pelo ensino de qualidade.
- A Profa. Dra. Carmélia Matos (HUB/UNB) pelo incentivo constante para eu fazer o Mestrado.
- A minha chefe de laboratório do HUB, Ana Beatriz, por nos valorizar como funcionários e entender a importância desta formação profissional.
- Aos colegas Aluizio, Melissa, Marcello e Waneli, pelos momentos de ajuda e/ou incentivo.
- Aos colegas Fabiano Queiroz (HUB/LACEN-DF) e Amabel Correa (LACEN-DF) pelas dicas acadêmicas valiosas, que foram úteis para a confecção deste material científico.
- A minha sogra Maria dos Santos Pereira, que sempre se colocou à disposição em ajudar a minha esposa Carla Santos, principalmente nesta etapa final do Mestrado, período de ausência com os nossos filhos.
- Ao Biotério da Faculdade Sena Aires (Valparaíso de Goiás-GO), pelos animais experimentais.
- Ao Sr. Dedé, técnico da Faculdade de Saúde, da UnB, pelos cuidados animais, fontes principais desta pesquisa.

- Ao Laboratório de Patologia, da Faculdade de Medicina, que sempre esteve de portas abertas para todos que desejam trabalhar de forma séria.
- A todos que sempre vibraram com o meu sucesso pessoal e profissional e que, esses espaços limitados e a ocasião, não aparecem listados.
- E, por fim, a aqueles que não acreditavam que eu conseguiria este título.

*“Só o que está morto não muda!
Repito por pura alegria de viver: a
salvação é pelo risco, sem o qual a
vida não vale à pena”*

Clarice Lispector

RESUMO

A *Melissa officinalis*, popularmente conhecida como erva-cidreira, tem sido usada predominantemente em distúrbios relacionados ao cérebro. Está bem documentado que os diferentes componentes dessa erva podem interferir no humor e na cognição de humanos e animais experimentais. Considerando esses aspectos, o objetivo deste estudo foi analisar os efeitos comportamentais e cognitivos do extrato de *Melissa officinalis* em dois modelos experimentais com possibilidade de traumas neurológicos: sepse experimental e administração de metilmercúrio (MeHg). Para tal, foram usados ratos machos Wistar (n= 150), conforme as recomendações do Comitê de Ética no Uso Animal (CEUA). Para a indução de sepse, os animais foram anestesiados com uma mistura de ketamina (80mg/kg) e xilazina (10mg/kg), seguida das cirurgias e exposição do ceco, com ou sem perfuração para o extravasamento das fezes. Ao final dos procedimentos cirúrgicos, todos os animais receberam ceftriaxona (30 mg/kg) e clindamicina (25 mg/kg). No segundo modelo experimental, os animais foram administrados com salina ou MeHg (100 mg/kg). O extrato de *M. officinalis* (100 mg/kg) foi administrado por via oral, durante uma semana após os procedimentos mencionados, quando os animais foram avaliados nos seguintes testes experimentais: campo aberto (locomoção), Labirinto em cruz elevado (LCE, ansiedade), nado forçado (depressão) e esQUIVA inibitória (memória). Considerando os resultados com sepse, observou-se que os animais que sobreviveram à perfuração cecal apresentaram uma redução no percentual de entradas nos braços abertos do LCE, enquanto aqueles administrados com MeHg reduziram o percentual de tempo nos braços abertos do LCE. Ambos procedimentos, não alteraram as locomoções dos animais no teste do campo aberto e na frequência nos braços fechados do LCE. Além disso, esses mesmos animais apresentaram um aumento no tempo de imobilidade no teste do nado forçado, enquanto que no teste de esQUIVA inibitória eles reduziram o tempo de permanência na plataforma do equipamento. O extrato de *M. officinalis* interferiu, de forma positiva, no bloqueio dessas respostas, aumentando os parâmetros das entradas e/ou tempo de permanência dos animais nos braços abertos do LCE e reduzindo o tempo de imobilidade no nado forçado. No teste da esQUIVA inibitória, os melhores resultados com *M. officinalis* foram observados com o grupo de animais que sobreviveram à sepse, visto que o extrato melhorou a memória de curta e longa duração dos referidos animais. Nos ratos que foram expostos ao MeHg somente a memória de longa duração melhorou com a administração do extrato. Considerando esses resultados conclui-se que a *M. officinalis* parece ter propriedades ansiolíticas, antidepressivas e mnemônicas relacionadas a possíveis traumas neurológicos decorrentes de processos infecciosos e também devido à exposição de contaminante ambiental.

Palavras-chave: Comportamento, Memória, *Melissa officinalis*, Metilmercúrio, Sepse

ABSTRACT

Melissa officinalis, commonly known as lemon balm has been used predominantly in the brain related disorders. It is well documented that different components of this herb may interfere with mood and cognition in humans and experimental animals. Considering these aspects, the aim of this study was to analyze the behavioral and cognitive effects of this ethanolic extract of *M. officinalis* in two experimental models with possibility of neurological trauma: experimental sepsis and administration of methylmercury (MeHg). For this purpose, male Wistar rats (n= 150) were used, as recommended by the Ethics Committee on Animal Use. To induce experimental sepsis, the animals were anesthetized with a mixture of ketamine (80mg/kg) and xylazine (10mg/kg), followed by surgery and exposure of the cecum, with or without perforation area for overflow of feces. At the end of the surgery, all animals received ceftriaxone (30 mg/kg) and clindamycin (25 mg/kg). In second experimental model, the animals were administered with saline or MeHg (100 mg/kg). *M. officinalis* ethanolic extract (100 mg/kg) was administered by oral route for one week after those mentioned procedures, when the animals were evaluated in the following experimental tests: open field (locomotion), elevated plus maze – EPM (anxiety), forced swimming (depression) or inhibitory avoidance (memory) tests. Considering the results with sepsis, we observed that sepsis survivor animals showed a decrease in the percentage of open arms entries of the EPM, while those administered with MeHg showed decrease in the percentage of open arms time of the EPM. Both procedures did not change the locomotion of the animals in the open field test and frequency in the enclosed arms of the EPM. Furthermore, the same animals belonging to these two experimental protocols also showed an increase in immobility time in the forced swimming test, whereas in the inhibitory avoidance test they reduced the latency in the platform of the equipment. *M. officinalis* interfered positively in blocking almost all these responses, increasing the parameters of entries and/or time spent in the open arms of the EPM and reduced the immobility time in the forced swimming. At the inhibitory avoidance test, the best result with *M. officinalis* was observed in sepsis procedures, since the extract improved short- and long-term memories of those animals. In rats that were exposed to MeHg only long-term memory was improved with the extract administration. Considering these results it is concluded that *M. officinalis* appears to have anxiolytic, antidepressant and mnemonic properties related to possible neurological traumas resulting from infectious processes and also due to exposure to environmental contaminants.

Keywords: Behavior, Memory, *Melissa officinalis*, Methylmercury, Sepsis

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 Potencial terapêutico dos produtos naturais	18
1.2 Sepsis: aspectos gerais	20
1.3 Metilmercúrio: aspectos gerais	23
1.4 Uso de modelos animais como perspectiva de novas descobertas para o déficits neurológicos	26
2 OBJETIVOS	28
2.1 Geral	29
2.2 Específicos	29
3 METODOLOGIA	30
3.1 Animais.....	31
3.2 Drogas e soluções.....	31
3.3 Preparação do extrato de <i>M. Officinalis</i>	31
3.4 Diluição do extrato.....	32
3.5 Cirurgia de Ligadura e Perfuração Cecal	32
3.6 Procedimentos experimentais	34
3.6.1 Teste do Campo aberto.....	34
3.6.2 Teste do Labirinto em cruz elevado	35
3.6.3 Teste do Nado forçado.....	36
3.6.4 Teste da Esquiva inibitória do tipo <i>step-down</i>	37
3.6.5 Resumo do desenho experimental.....	40
3.7 Análises estatísticas.....	40
4. RESULTADOS	41
4.1 Sepsis induzida experimentalmente	42
4.1.1 Teste do Campo aberto.....	42
4.1.2 Teste do Labirinto em cruz elevado	42
4.1.3 Teste do Nado forçado.....	44
4.1.4 Teste da Esquiva inibitória do tipo <i>step-down</i>	45

4.2 Intoxicação por MeHg	46
4.2.1 Teste do Campo aberto.....	46
4.2.2 Teste do Labirinto em cruz elevado	47
4.2.3 Teste do Nado forçado.....	48
4.2.4 Teste da Esquiva inibitória do tipo <i>step-down</i>	49
5 DISCUSSÃO	51
6 CONCLUSÕES	55
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	58
ANEXO	71
Comprovante do Comitê de Ética no Uso Animal (CEUA)	72

1. INTRODUÇÃO

As plantas medicinais têm desempenhado um papel importante no tratamento de muitas doenças, favorecendo principalmente a população de baixa renda que, com frequência, busca na medicina natural a solução de seus problemas de saúde (ALNAMER et al., 2012; CHOI et al., 2013). Nas últimas décadas, as publicações voltadas para as propriedades terapêuticas de muitas espécies de plantas advindas da natureza aumentaram consideravelmente. Dessa forma, foi aumentando o interesse dos pesquisadores na busca de novos princípios biológicos capazes de interferir na demanda diversificada de doenças que acometem a saúde pública mundial.

Dentre algumas das alternativas consideradas pela população, a *Ginkgo biloba* tem se mostrado efetiva em triagens clínicas para o tratamento da Doença de Alzheimer e demências vasculares (GERTZ e KIEFER, 2004). A galantamina, um alcalóide obtido de bulbos e flores da *Galantus woronowii* (Amaryllidaceae), também é um composto muito utilizado contra os sintomas da Doença de Alzheimer (HEINRICH e TEOH, 2004). A atropina, a pilocarpina, os glicosídeos cardíacos, o curare e a reserpina recebem destaque por sua aplicabilidade medicinal ou por ter contribuído para a formulação de novos fármacos (ADAMS et al., 2007). A valeriana, passiflora e melissa foram desenvolvidos comercialmente por suas eficácias e reduzidos efeitos adversos (BOURIN et al., 1997).

Desses fitoterápicos, chama-se atenção à aplicabilidade terapêutica da *Melissa officinalis* L. (*M. officinalis*) é preparada à base de plantas nativas da região do Mediterrâneo Oriental e Ásia Ocidental, muito comum também no Brasil. Ela tem sido tradicionalmente usada como tônica, antiespasmódica, carminativa, diurética, sedativa/hipnótica, para melhorar o humor, a memória e alívio da dor de cabeça (KENNEDY et al., 2002, 2004, 2006; VANE e BOTTING., 1995). Dentre as propriedades terapêuticas mais reladas na literatura científica, os efeitos produzidos no Sistema Nervoso Central (SNC) merecem destaques, isto porque ela pode reduzir os níveis elevados de estresse, ansiedade, tensão e insônia em humanos (CASES et al., 2011; KENNEDY et al., 2004; 2006) e animais experimentais (TAIWO et al., 2012).

A saúde mental vem sendo pauta de muitas discussões no cenário

científico, isto porque as doenças oriundas do SNC podem resultar em significantes mudanças comportamentais e emocionais, como a depressão, impulsividade, ansiedade, agressividade e desordens decorrentes de estresse pós-traumático (STARKSTEIN e PAHISSA, 2014). As causas geradoras dessa interferência central, entretanto, podem ser muito diversificadas, chamando a atenção para aquelas decorrentes de processos inflamatórios e/ou infecciosos (LEITE et al., 2013), e as que são provenientes de contaminação ambiental (LUCENA et al., 2010, 2013; MAIA et al., 2010).

Considerando a susceptibilidade do SNC a muitos fatores, não surpreende que respostas inflamatórias como as decorrentes da sepse, por exemplo, afetem as funções cerebrais, principalmente por conta de um quadro de encefalopatia séptica (NAMAS et al., 2012). Esta infecção continua sendo um desafio para a saúde pública mundial, mesmo após anos de estudos e progressos na compreensão da doença (DELLINGER et al., 2013; SILVA et al., 2004). A incidência de sepse tem aumentado ao longo dos anos, e as taxas de mortalidade permanecem altas, que varia entre países e continentes (DELLINGER et al., 2013; TELES et al., 2008).

A encefalopatia pode ser explicada como um rompimento das funções normais do SNC pelas mudanças no metabolismo, alterações na sinalização celular decorrentes de mediadores inflamatórios, que refletem no funcionamento regular do cérebro e do organismo como um todo (GARDNER et al., 2014). Como consequência, pode desencadear anormalidades motoras, depressão, ansiedade traumática e prejuízos de memória (MCKEE et al., 2009; OMALU et al., 2005; STERN et al., 2011). Relatos científicos mostram que essa condição clínica pode também ser afetada por compostos químicos como, por exemplo, o mercúrio e suas formas químicas (BENSEFA-COLAS et al., 2011)

O metilmercúrio (MeHg) é um dos contaminantes ambientais mais conhecidos por seus efeitos tóxicos em seres humanos e animais experimentais (CARVALHO et al., 2011; CLARKSON e MAGOS., 2003). Ele é, em grande parte, derivado do mercúrio inorgânico metilado transformado, principalmente, por microorganismos aquáticos, com subsequente acumulação na cadeia alimentar

aquática sendo, posteriormente, sendo consumido por humanos (DÓREA, 2008). Além disso, provoca danos agudos e crônicos em múltiplos órgãos, principalmente quando as exposições ocorrem durante o período de desenvolvimento neural (CARVALHO et al., 2011; DALLA CORTE et al., 2013; GRANDJEAN e HERZ., 2011).

Muitos estudos têm avaliado os aspectos aqui abordados em vários modelos experimentais, com o objetivo de melhor caracterizar os aspectos patológicos frente aos processos inflamatórios/ infecciosos e de neurotoxicidade (LEITE et al., 2013; LUCENA et al., 2010, 2013; MAIA et al., 2009, 2010). Os modelos experimentais *in vivo* e *in vitro* certamente facilitam um melhor entendimento de muitas lacunas que ainda se fazem presentes no conhecimento científico. Os métodos *in vitro* são úteis para a investigação preliminar do possível potencial de um produto, principalmente porque se eles produzirem resultados positivos, novas investigações normalmente são necessárias para fornecer dados com relevância clínica que poderão ser complementados por ensaios *in vivo* (HEINRICH et al., 2008).

Tendo com base esta premissa, e considerando que para as pesquisas envolvendo produtos naturais os estudos *in vivo* são essenciais para uma melhor consolidação dos dados obtidos do seu uso popular, coube aqui nosso interesse nas investigações das alterações comportamentais e cognitivas decorrentes de prováveis alterações neurológicas geradas pelos processos infecciosos e de contaminantes ambientais como, por exemplo, a exposição ao MeHg em animais experimentais tratados com o extrato de *M. officinalis*.

1.1 Potencial terapêutico dos produtos naturais

A Amazônia e o Cerrado brasileiro dispõem de uma riqueza exuberante de espécies com potenciais terapêuticos, fazendo com que o Brasil seja um dos países mais ricos do mundo no fornecimento de matéria-prima que poderiam ser amplamente exploradas pelas indústrias farmacêuticas (FONTES JR et al., 2009). Dados estatísticos sobre a taxa de consumo de produtos naturais para as doenças provenientes de diferentes causas são praticamente nulos em nosso país. No entanto, nos Estados Unidos da América (EUA) há registro de que cerca de 20% de sua população usam esses produtos, ainda que não tenha qualquer evidência científica boa de sua efetividade, com seis de seus dez produtos mais populares sendo consumidos com a crença de que eles podem beneficiar muitos males, principalmente aos relacionados com as funções do cérebro (BENT, 2008)

Embora em um arsenal farmacoterapêutico contemporâneo estejam incluídas várias alternativas sintéticas formuladas para modificar os danos fisiológicos e funções cerebrais, a medicina natural nunca deixou de ser desconsiderada no contexto da saúde da população mundial. Há cerca de 7 anos, aproximadamente metade das drogas licenciadas registradas mundialmente eram provenientes de produtos naturais ou de seus derivados sintéticos. Entretanto, somente três de um total de 84 psicotrópicos registrados nesse período ficaram nesta classe (KENNEDY e WIGHTMAN, 2011; NEWMAN e CRAGG, 2007)

A *M. Officinalis* (Fig. 1), conhecida como “erva cidreira” devido ao seu aroma de limão, pertence à família Labiateae, e tem seu arsenal terapêutico atribuído a muitos componentes químicos ativos. De suas folhas é possível extrair taninos, flavonóides e óleos essenciais, que são os principais responsáveis por várias de suas propriedades terapêuticas. Trabalho recente mostrou que o ácido rosmarínico é um dos principais componentes implicados com suas respostas farmacológicas (DORING et al., 2014). Normalmente ela é comercializada na forma de chá (BOUNIHI et al., 2013; DORING et al., 2014).

Esta espécie também chama atenção pelas suas propriedades analgésicas antibacterianas, antivirais e antifúngicas (MIMICA-DUKIC et al., 2004; SUMALAN et

al., 2013). Recentemente, esse fitoterápico mostrou ser eficaz como neuroprotetor após a hipóxia-isquêmica cerebral (BAYAT et al., 2012) e com propriedade antioxidante após a indução de estresse oxidativo induzido pelo manganês (MARTINS et al., 2012).



Figura 1. Melissa officinalis de suas formas de apresentação: Folhas da planta e forma como é consumida (Fontes: Doring et al., 2014 e www.patriciadavidson.com.br)

Os mecanismos de ação responsáveis pelas propriedades farmacológicas apresentadas por esse fitoterápico ainda não estão totalmente esclarecidos. No entanto, tem crescido o interesse de pesquisadores na investigação de seus alvos de ação. Perry et al. (1996) e Wake et al. (2000), observaram que o sistema colinérgico, por meio dos seus receptores nicotínicos e muscarínicos, poderia ser um dos principais responsáveis por suas ações farmacológicas, isto porque diversos componentes da folha desse espécie de planta apresentaram ligações nos dois subtipos de receptores, sendo que a proporção maior foi nos nicotínicos.

A *M. officinalis*, pode ser apresentada como uma dessas riquezas usadas para o tratamento das desordens do SNC e, ainda, constituir um grande investimento para a medicina moderna no que concerne as consequências comportamentais e cognitivas de prováveis déficits neurológicos decorrentes de processos inflamatórios/infecciosos e/ou provenientes de danos causados por contaminantes ambientais.

1.2 Sepses: aspectos gerais

A sepsis é uma resposta imune frente a uma agressão por microorganismos decorrente de uma infecção levando a um quadro conhecido como Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica – SRIS (BONE et al., 1992). Este conceito foi considerado em 1992, após um consenso liberado em uma conferência norte americana, no entanto foi revisto em 2001, quando ela foi considerada uma infecção com diagnóstico confirmado ou com suspeita, onde o paciente pode apresentar sinais e sintomas de uma resposta inflamatória (LEVY et al., 2003; VINCENT et al., 2013).

Pelo fato da sepsis poder ser causada por bactérias, vírus e fungos, ela pode ser caracterizada por dois estágios distintos: pró-inflamatório e anti-inflamatório. O primeiro, que inicialmente predomina, normalmente está relacionado à grande demanda de citocinas, onde o sistema imunológico inato as libera sistemicamente na tentativa de combater a infecção. Esse sistema também recruta outros mediadores para auxiliarem na resposta imune na defesa do organismo. O estágio anti-inflamatório, por sua vez, considerada uma resposta inflamatória compensatória, segue a etapa iniciada pela SRIS (NAMAS et al., 2012; WARD et al., 2008), sendo que esta última condição é definida como a incapacidade do organismo para responder a uma mudança antigênica e/ou infecciosa definida (HUTCHINS et al., 2014).

A encefalopatia é uma das consequências relacionadas a esta situação, podendo ser causada por desordens metabólicas, exposição à toxina, microorganismos, metais pesados, radiação e danos neurológicos. Esta síndrome é considerada uma das mais frequentes e é estimado que 9 a 71% dos pacientes com sepsis apresentam sintomas nesse quadro (ZIAJA, 2013). Apesar de ser descrita como uma síndrome reversível, estudos indicam que os pacientes podem apresentar prejuízos cognitivos de longa duração e distúrbios depressivos após uma recuperação de um quadro séptico. Sendo que a recuperação destes danos geralmente é demorada (PAPADOULOS et al., 2000; PYTEL e ALEXANDER, 2009; ZIAJA, 2013).

Considerando esses aspectos, não se torna surpreendente que esta doença acaba se constituindo a décima causa de morte nos EUA entre os pacientes críticos internados em Unidade de Terapia Intensiva (UTI). São notificados aproximadamente 250.000 casos anualmente naquele país e que representa um custo econômico elevado para a saúde pública (ANGUS et al., 2001; GAIESKI et al., 2013). Mais de 70% de suas mortes ocorrem após os três primeiros dias da infecção e aumenta o índice nas semanas seguintes depois dela instalada (OTTO et al., 2011). Alguns pesquisadores descrevem que a taxa mundial de mortalidade por sepse poderia ser até maior, mas existem falhas nos dados tendo em vista a sua falta de notificação, dados hospitalares administrativos incompletos, e algumas peculiaridades próprias dos serviços de saúde pública (WANG et al., 2014).

No Brasil, ela é responsável por 25% da ocupação de leitos em UTI, sendo uma das principais causas de mortalidade hospitalar nessas unidades, superando o infarto do miocárdio e o câncer. Na sua forma mais grave (choque séptico) tem alta mortalidade, ultrapassando 60% dos casos, enquanto a média mundial está em torno de 37%. Segundo um levantamento feito pelo estudo mundial conhecido como *Progress*, a mortalidade por essa tipo de inflamação no Brasil é maior que a de países como a Índia e a Argentina (WHO, 2010).

Frente a este panorama apresentado, e apesar da resposta imune desregulada conduzir à falha múltipla dos órgãos, as descobertas relacionadas com a resposta do hospedeiro à infecção ainda são escassas e apresenta muitas lacunas no conhecimento científico, isto porque pacientes que sobrevivem a sepse grave ou choque séptico decorrentes de infecções variadas, têm um índice de mortalidade ainda elevado (KING et al., 2014). Os resultados obtidos das diversas pesquisas, ainda com descobertas relativamente limitadas, auxiliam no tratamento das consequências em longo prazo. Esta lacuna no conhecimento é importante, pois o impacto econômico na saúde pública de uma doença engloba, principalmente, os cuidados hospitalares agudos (WANG et al., 2014).

Dentre a diversidade de pesquisas nesta área, os neuropeptídeos chamam a atenção por possuírem diversas funções a partir de seus neurohormônios e

neurotransmissores. As ações de muitos peptídeos são mediadas por vários subtipos de receptores acoplados pela proteína G, localizados em diferentes regiões cerebrais. Essas substâncias são distribuídas de forma heterogênea por todo o cérebro e podem ser expressas nos corpos celulares, dendritos e terminais axônicos, interferindo na cascata de sinalização que interfere na homeostasia celular que pode ser afetada pela sepse (Figura 2). Dessa maneira, essas substâncias podem estar relacionadas a uma variedade de respostas como, por exemplo, locomoção, aprendizagem, memória, estresse e dor, sugerindo seus envolvimento nas doenças neuropsiquiátricas, incluindo a encefalopatia séptica (PINHEIRO DA SILVA et al., 2013).

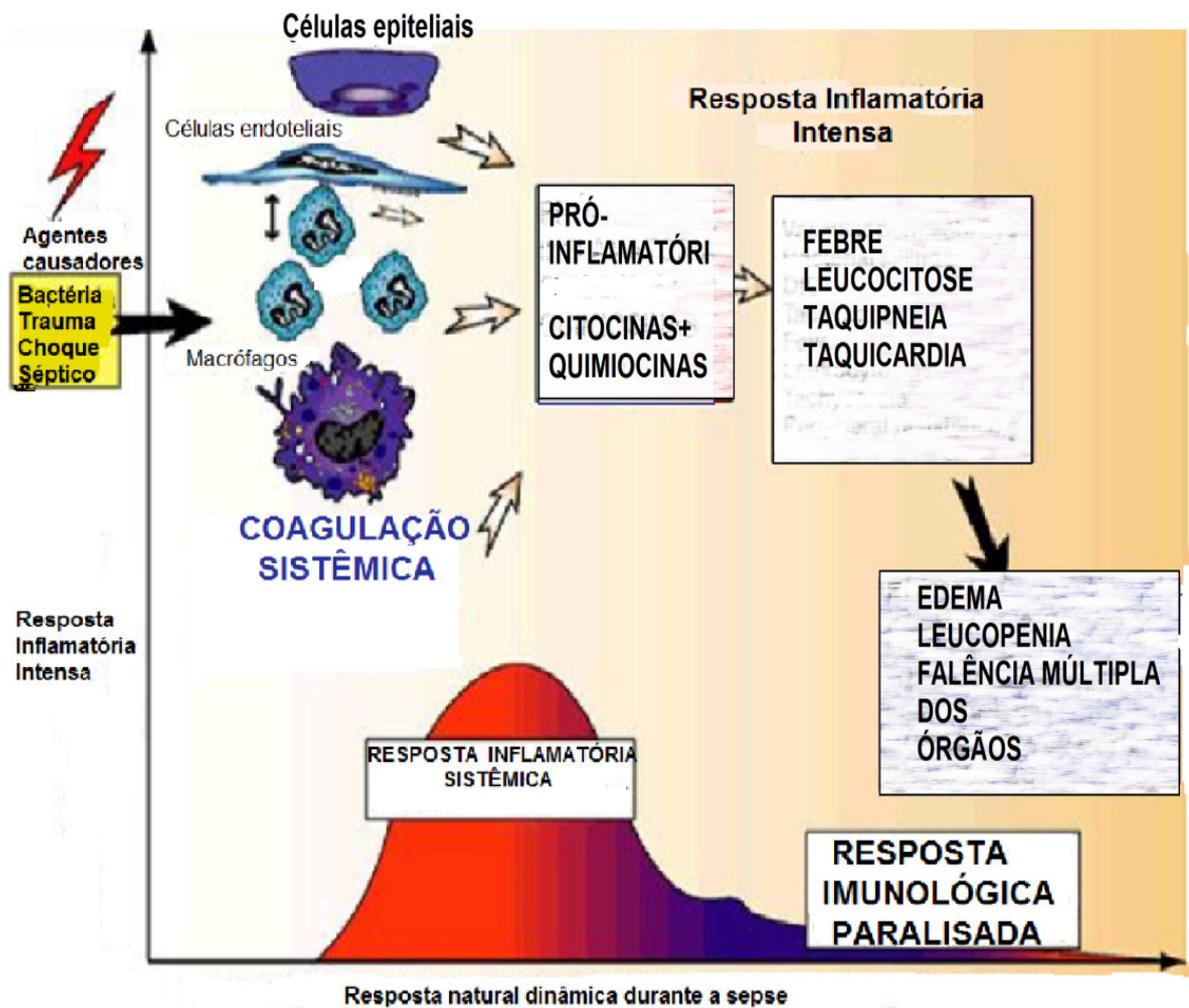


Figura 2 – Principais mediadores inflamatórios relacionados com a sepse mostrando a cascata da ação das substâncias envolvidas no seu processo de instalação (modificado de PINHEIRO DA SILVA et al., 2013).

1.3 Metilmercúrio: aspectos gerais

O mercúrio é um metal pesado que, nas últimas décadas, tem sido alvo de muitas pesquisas no mundo, devido às consequências decorrentes da intoxicação em humanos e contaminação ambiental (ROONEY et al., 2014). Na Amazônia, as possibilidades de extração de minérios naturais têm aumentado a contaminação do meio ambiente pelo mercúrio (GOCHFELD, 2003). Naturalmente, esse metal sofre uma série de reações e é convertido na forma inorgânica e orgânica conforme demonstrado na ilustração a seguir (Figura 3).

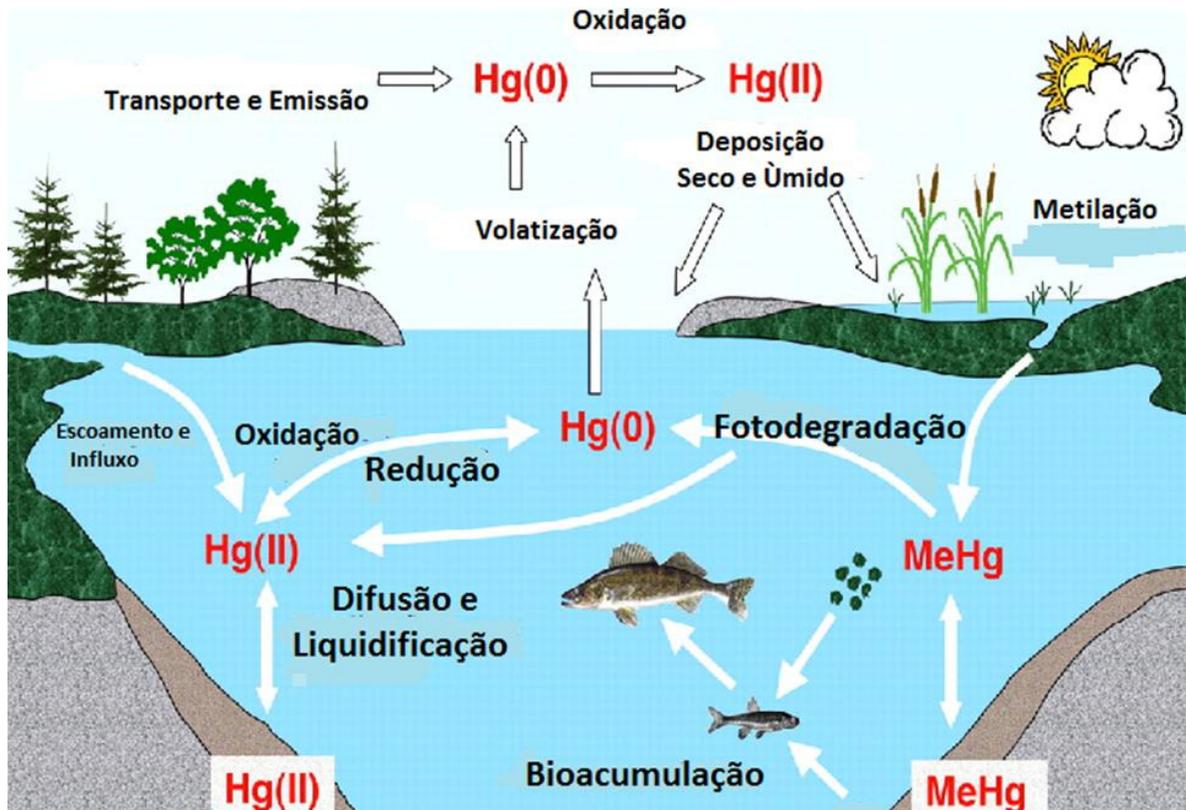


Figura 3 – Etapas do processo do ciclo do mercúrio por meios naturais. O mercúrio presente no ar atmosférico sofre processos de oxidação para a transformação do mercúrio inorgânico (Hg^{2+}), presentes no solo, rios e lagos. O metilmercúrio (MeHg) será gerado a partir da metilação do Hg^{2+} (Fontes: Google, acesso em 06 de fevereiro de 2014).

O MeHg é um dos produtos decorrentes dessa série de reações, sendo um agente altamente tóxico que pode causar efeitos irreversíveis ao SNC. A sua exposição durante o desenvolvimento precoce pode estar associada com danos

cerebrais (GRANDJEAN e LANDRIGAN, 2006). Evidência de neurotoxicidade de origem ambiental foi observada em um estudo em Minamata, no Japão. Os altos consumos de frutos do mar contaminados levaram a alguns sintomas em mulheres grávidas que, mais tarde, tiveram comprometimento no crescimento de recém-nascidos mostrando um difuso e severo dano cortical, onde as crianças apresentaram sérias dificuldades neurológicas incluindo a visão, fala, audição, motricidade, parestesia e retardo mental (HARADA, 1995).

A contaminação ambiental tem sido proposta como possível causa de doenças neurodegenerativas (LANDRIGAN et al., 2005). O MeHg é conhecido ser um potente neurotóxico ambiental causando distúrbios neuropsicológicos em humanos (BISEN-HERSH et al., 2013). Estudos experimentais e epidemiológicos têm mostrado que o desenvolvimento do SNC é particularmente vulnerável a sua toxicidade. Essas observações devem-se, principalmente, ao fato deste metal atravessar a barreira-placentária, afetando especialmente o cérebro em desenvolvimento de fetos e neonatos causando efeitos tóxicos, haja vista que ele pode ser transportado pela via placentária e amamentação (LUCENA et al., 2010, 2013).

Populações que fazem uso de alto consumo de peixes têm sido submetidas a estudos epidemiológicos (JULVEZ et al., 2012). Isso se deveu principalmente a necessidade de padronizar as doses máxima aceitáveis na exposição do ser humano ao MeHg em qualquer situação. Esta padronização ocorreu graças a pesquisas com animais laboratoriais que, até certo ponto, reproduziram a situação que ocorreu no Japão e no Iraque (AMIN-ZAKI et al., 1979; BURBACHER et al., 1990). A exposição a baixas doses de MeHg contido na alimentação com frutos do mar na população é considerada um fator de risco para o desenvolvimento de distúrbios cognitivos (memória, atenção e linguagem) em crianças e adolescentes consumidoras de peixes nas ilhas Faroé (GRANDJEAN et al., 1997).

A toxicidade do MeHg nos vários aspectos fisiológicos, bioquímicos e comportamentais, portanto, pode ser explicada por muitos mecanismos celulares, sendo o estresse oxidativo, um dos principais processos responsáveis por

caminhos alvos da excitotoxicidade, que leva a peroxidação da membrana e geração de várias espécies reativas de oxigênio. O comprometimento no funcionamento neuronal, portanto, pode ser devido a essa toxicidade intracelular (ROONEY, 2014).

Esta exposição ao MeHg e suas consequências em humanos pode ser reproduzida por diferentes modelos animais que mostraram o seu efeito neurotóxico nas populações consumidoras de peixes. Devido às diferentes espécies de modelos experimentais que foram usados para investigar a toxicocinética do MeHg, torna-se difícil correlacionar as doses usadas em estudos animais em comparação com a exposição em humano. Portanto, os únicos parâmetros que puderam ser levados em consideração foram as desordens comportamentais decorrentes da contaminação por MeHg. Um exemplo claro dessa situação foi as suas concentrações no encéfalo de crianças em Seychelles, que variaram de 0,026 a 0,295 micrograma/g, porém as disfunções cognitivas não foram encontradas na mesma população (DAVIDSON et al., 2004; LAPHAM et al., 1995).

Assim, focando na base neuroquímica desse metal na indução das alterações comportamentais, é possível notar que ela pode ser devida não somente a aquelas substâncias previamente mencionadas, mas também aos distúrbios em vários sistemas de neurotransmissores, inicialmente ocorrendo durante a exposição seguida de prejuízos de longa duração no funcionamento cerebral. Dentre esses efeitos incluem déficits sensoriais (CARTA et al., 2003; HERCULANO et al., 2006), disfunção motora (ASCHNER e SYVERSEN, 2005), genotoxicidade (CRESPO-LÒPEZ et al., 2007), e outros efeitos na linguagem, atenção e cognição (CLARKSON e MAGOS, 2006; GRANDJEAN e LANDRIGAN, 2006).

Diante do exposto, nos últimos anos foi dada uma grande importância para as pesquisas laboratoriais envolvendo diferentes modelos animais para novas descobertas científicas, principalmente na descoberta de novos fármacos ou fitofármacos com menor ou nenhum efeito tóxico ao organismo.

1.4 Uso de modelos animais como perspectiva de novas descobertas para os déficits neurológicos

Os danos do cérebro com seus diversificados problemas neuronais representam um dos mais sérios problemas de saúde que acometem cerca de 1,5 milhões de pessoas nos EUA (LUO et al., 2014). Apesar de muitos pacientes não apresentarem consequências de longa duração, cerca de 7-30% sofre de vários comprometimentos nos aspectos físicos, cognitivos e emocionais (SILVER et al., 2009; WILLIAMS et al., 2010). Dentre os sintomas de longa duração incluem ansiedade, apatia, depressão e prejuízos de memória com dificuldade nas concentrações (SILVER et al., 2009; WILLIAMS et al., 2010).

A ansiedade e depressão são comuns na população mundial e representam as duas categorias de doenças mais frequentemente diagnosticadas (MATCHAM et al., 2014). Apesar de a ansiedade ser considerada como a mais comum de todos os transtornos mentais, as suas taxas de prevalência pode variar de 15 a 25%, enquanto que as de depressão ficam entre 10 a 18% (WITTCHEN et al., 2003). Além disso, elas podem estar associadas aos fatores de risco como, por exemplo, baixa qualidade de vida, sedentarismo, pouca aceitação a medicamentos e idade. Portanto, as suas reduções podem melhorar o estado físico e psíquico dos pacientes (MATCHAM et al., 2014).

Estudos têm demonstrado uma frequência aumentada da ansiedade e depressão entre os pacientes com elevados níveis de prejuízos cognitivos (KING et al., 2014; STARKSTEIN e PAHISSA, 2014). A melhor forma de se avaliar essa correlação é por meio de modelos animais que têm sido muito úteis na investigação dos efeitos deletérios decorrentes das sequelas do SNC (LEITE et al., 2013; LUCENA et al., 2010, 2013; MAIA et al., 2009).

Estudos toxicológicos parecem ser mais relevantes em camundongos que em ratos, visto que a toxicocinética dos primeiros parece ser mais similar aos de humanos (YOUNG et al., 2001), entretanto apenas alguns estudos de efeitos de exposição crônica do MeHg em camundongos tem sido publicados (GOULET et al., 2003; MARKOWSKI et al., 1998; WEISS et al., 2005). Em contrapartida, outros

resultados obtidos com MeHg pareceram não ser dependentes do modelo experimental, mas sim do gênero, dose e tempo de administração (CAGIANO et al., 1990; ECCLES e ANNAU, 1982; GOULET et al., 2003). Essas observações farmacocinéticas foram obtidas de vários estudos reproduzindo o consumo desse metal em humanos por meio de comidas e bebidas. A exposição de MeHg na água de beber administradas a ratas grávidas, por exemplo, fizeram com que as suas proles apresentassem incoordenação motora (FUJIMURA et al., 2012; WEISS et al., 2005) e comprometimento de atividade locomotora (CHENG, 2013; GOULET et al., 2003; ONISHCHENKO et al., 2007).

Síndromes depressivas também foram relatadas em humanos adultos após a exposição de MeHg inorgânico (GRUM et al., 2006). Esse tipo de comportamento, quando avaliado em camundongos no teste do nado forçado, mostrou perfil sugestivo de depressão (ONISHCHENKO et al., 2007). A exposição crônica de baixos níveis de MeHg também foram avaliados em vários outros modelos experimentais, como a atividade no campo aberto, coordenação motora e labirinto em cruz elevado (CAGIANO, 1990; NEWLAND., 2008; ONISHCHENKO et al., 2007).

Déficits de aprendizado e de memória são preocupações no desenvolvimento de pesquisas acerca da exposição do MeHg como os estudos prospectivos de populações clínicas que têm sido relatados com escores prejudicados nos testes de memória, atenção e linguagem (GRANDJEAN et al., 1997). Fazendo-se uma analogia dessas observações em humanos com os animais experimentais foram observados prejuízos significantes dessas respostas em ratos e camundongos, quando avaliados no labirinto aquático de Morris e labirinto em Y (CHENG et al., 2013; FUJIMURA et al., 2012).

Considerando os dados aqui apresentados, complementados por conhecimentos obtidos de pesquisas envolvendo seres humanos, a nossa proposta foi avaliar as propriedades neuroprotetoras do extrato de *M. officinalis* nas alterações comportamentais e cognitivas decorrentes de possíveis danos neurológicos induzidos em modelos experimentais de inflamação sistêmica e neurotoxicidade.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral:

Avaliar as propriedades neuroprotetoras do extrato da *Melissa officinalis* nas alterações comportamentais e cognitivas decorrentes de sepse induzida experimental e intoxicação por MeHg.

2.2 Específicos:

- Observar os parâmetros comportamentais relacionados à locomoção, ansiedade e depressão de ratos que passaram por procedimentos cirúrgicos com e sem indução de sepse experimental e mediante a intoxicação por MeHg, quando avaliados no teste do campo aberto, labirinto em cruz elevado e teste do nado forçado, respectivamente;
- Avaliar as alterações cognitivas no teste da esquiva inibitória dos mesmos ratos que passaram por procedimentos cirúrgicos com e sem indução de sepse experimental e mediante a intoxicação por MeHg;
- Investigar as propriedades terapêuticas do extrato etanólico da *M. officinalis* nas alterações de comportamentos e déficits cognitivos nas mesmas condições experimentais apresentadas previamente.

3. METODOLOGIA

3.1 Animais

Para a realização dos testes experimentais foram utilizados ratos Wistar machos (n=150), com 2,5 meses, com uma média de 300 g, provenientes do Biotério da Faculdade Sena Aires (Valparaíso de Goiás-GO) e mantidos durante o período de uma semana para habituação no Laboratório de Patologia, da Faculdade de Medicina/UnB. Os animais foram alojados em grupos de cinco por caixa, mantidos em ciclo claro/escuro de 12 horas, temperatura ambiente, com água e ração *ad libitum*. Todos os critérios da pesquisa estiveram de acordo com as normas estabelecidas por Guias de Cuidado e Uso de Animais Laboratoriais. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso Animal (CEUA), do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília (protocolo 33880/2009), conforme comprovante anexado na página 72.

3.2 Drogas e soluções

O MeHg (100 mg/kg); diazepam (DZP - 1 mg/kg), controle positivo para ansiedade; fluoxetina (FXT - 10 mg/kg), controle positivo para depressão, e cafeína (CAF - 10 mg/kg), controle positivo para memória, foram obtidos da Sigma Chemical Co., USA, sendo todas administradas por via oral (v.o.). Para os procedimentos cirúrgicos, a ketamina (80 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg) foram obtidas da Syntec, e os antibióticos clindamicina (25 mg/kg) e gentamicina (3 mg/Kg) foram obtidos do Laboratório EMS, sendo administrados por via intraperitoneal (i.p.). Com exceção da associação anestésica, todas as demais substâncias foram dissolvidas em solução salina (NaCl 0,9%). As doses escolhidas foram baseadas em pesquisas prévias (LEITE et al., 2013; LUCENA et al., 2007, 2010, 2013).

3.3 Preparação do extrato de *Melissa officinalis*

Folhas secas de *M. officinalis*, obtidas pela Centroflora (Botucatu, Brasil), foram separadas de seus caules e secas sob a luz solar. Após a evaporação da

água, cerca de 300 mg de folhas secas foram moídas e colocadas em um frasco com etileanol a 95%, em quantidade suficiente para cobri-las e mantidas nesse procedimento durante sete dias. O frasco com o extrato etanólico foi vedado para evitar a evaporação do álcool. Após uma semana, o extrato de *M. officinalis* foi filtrado e transferido para um rota-vapor sendo, em seguida, colocado para evaporar. Após todo o solvente ter sido evaporado, as soluções estoques foram armazenadas em um refrigerador (4°C).

3.4 Diluição do extrato

A concentração de 100 mg/mL do extrato alcoólico de *M. officinalis* foi preparada, considerando a seguinte mistura de solventes: 150 µL de tween 80, 150 µL de álcool e 150 µL de DMSO, totalizando 450 µL de solução. O extrato foi misturado com a solução de solventes na proporção de 1:1. Em seguida, foi adicionada salina (0,9% NaCl) lentamente até completar o volume de 4 mL, sendo que a mistura foi preparada de forma vigorosa para conseguir a maior homogeneização possível da preparação e evitar os precipitados. A solução foi administrada na dose de 100 mg/kg, baseada em estudos prévios realizados por nosso grupo de estudo (TAIWO et al., 2012). Esta correlação de preparação do extrato foi baseada no princípio de que 1 mL do extrato foi dado para cada 1 kg do animal. O tratamento agudo foi feito por via oral, segundo a técnica de gavagem, para garantir que o animal recebesse a dose total administrada sem perdas. Além disso, essa via de escolha foi visando reproduzir a forma de administração usada em humanos.

3.5 Cirurgia de Ligadura e Perfuração Cecal (CLPC)

Após serem anestesiados com ketamina (80 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg) via i.p., os animais passaram pelos procedimentos demonstrados na Figura 4. Foi feita a tricotomia na parte ventral dos animais, seguida da incisão central de aproximadamente 2 cm, para favorecer a exposição do ceco e obstrução (ligadura parcial) no segmento distal próximo da válvula ileocecal. O ceco foi perfurado com agulha 14G na borda antimesentérica. Após a verificação da saída de fezes do

ceco, essa estrutura foi retornada à cavidade abdominal. A incisão cirúrgica foi fechada em 2 planos de sutura fáschia e músculos abdominais com poliéster 4 (0) em pontos contínuos. No final dos procedimentos, foi administrado um volume de 3 mL de solução salina, via subcutânea (s.c.), como líquido de reanimação. Os animais controles (Operação Fictícia - OF) passaram por todas as etapas cirúrgicas, porém sem perfuração do ceco e ligadura (LEITE et al., 2013). Todos os animais OF e de sepse receberam as doses dos antibióticos clindamicina (25 mg/kg) e gentamicina (3 mg/Kg), por via i.p. A *M. officinalis* (100mg/kg, v.o.) foi administrada com 24h após os procedimentos cirúrgicos e os testes experimentais ocorreram 60 min após a última administração.



Figura 4 - Cirurgia de ligadura e perfuração cecal (CLPC). A= Incisão central no ventre do rato e exposição do ceco, B= A seta representa o local de ligadura com posterior perfuração do ceco e liberação das fezes. C= Inserção do órgão perfurado na cavidade abdominal, seguida de sutura interna e externa, D= Incisão cirúrgica suturada, E= animais em recuperação cirúrgica. OF= Operação fictícia.

3.6 Procedimentos experimentais

3.6.1 Teste do Campo Aberto

Aparato: Arena em madeira (60x60x35 cm), com o chão dividido em nove quadrantes de 20x20 cm (Figura 5).



Figura 5 – Teste do Campo aberto dividido em 9 quadrantes para avaliar a atividade locomotora dos ratos. Inicialmente, o animal é posicionado no centro da arena para, posteriormente explorar o equipamento durante 5 min.

Fundamento: A avaliação de roedores em uma arena ou campo aberto é um procedimento muito utilizado por vários pesquisadores, com a finalidade de se observar a atividade locomotora de animais de pequeno porte (LUCENA et al., 2010). Em um primeiro momento, sabe-se que ratos, assim como os seres humanos, podem reagir ao ambiente considerado “novo” e apresentar uma resposta aversiva, característica de congelamento (do inglês *freezing*), que é um comportamento típico que, muitas vezes, os animais usam como forma de diminuir as detecções auditivas por parte dos predadores. No entanto, em um segundo momento, ele tende a explorar o ambiente onde se encontra.

Procedimento experimental: Antes do início dos experimentos, os animais foram levados ao laboratório por um período de, no mínimo, uma hora, para aclimação e habituação ao ambiente do teste. A atividade locomotora foi considerada

quando o animal atravessava um dos quadrantes do campo aberto com as quatro patas. Cada animal foi testado por um período de 5 min. Todos os experimentos foram conduzidos entre 08:00 e 12:00 h, com o objetivo de evitar a influência de variações circadianas, que poderiam interferir com os resultados experimentais.

3.6.2 Teste do Labirinto em cruz elevado (LCE)

Aparato: Equipamento em madeira, na forma de cruz, elevado 50 cm do chão, com dois braços fechados (50x10x40 cm) e dois abertos (50x10 cm), opostos entre si (HANDLEY e MITHANI, 1984). Uma proteção de acrílico transparente de 1 cm de altura circundava os braços abertos com o objetivo de impedir a queda dos animais do LCE (Figura 6).



Figura 6 – Teste do Labirinto em cruz elevado utilizado para se avaliar a resposta ansiolítica ou ansiogênica das substâncias administradas nos ratos. O animal é sempre colocado no centro do labirinto para ter a escolha de explorar os braços abertos ou fechados durante um período de 5 min.

Fundamento: O LCE é baseado na aversão natural que roedores apresentam pelos braços abertos do labirinto. Quando são forçados a permanecerem nesses braços mostram manifestações fisiológicas e comportamentais de medo, tais como congelamento, defecação e aumento nos níveis de corticosteroides

plasmáticos (PELLOW et al., 1985). Como consequência, eles permanecem um tempo maior nos braços fechados. Treit et al. (1993) indicaram que o fator de maior contribuição para esta “reação de medo” era a falta das paredes altas nos braços abertos, que impedia a tigmotaxia. A proporção da exploração total nos braços abertos determinava uma medida de ansiedade, de tal modo que o aumento nas porcentagens de tempo de permanência e de entradas nos braços abertos era considerado como indicativo de ação ansiolítica de drogas (HANDLEY e MITHANI, 1984; PELLOW et al., 1985).

Procedimento experimental: Cada rato foi posicionado no centro do LCE, com a face voltada para um dos braços fechados e colocado para explorar o equipamento por 5 min. O pesquisador fez as anotações do número de entradas e do tempo de permanência dos animais nos braços abertos (EBA e TBA, respectivamente) e o número de entradas e o tempo de permanência dos animais nos braços fechados (EBF e TBF, respectivamente). As porcentagens de EBA (%EBA) foram calculadas em relação ao número total de entradas nos dois braços e ao tempo de exploração nesses braços em relação ao tempo total do experimento. Essas porcentagens (%) da EBA e TBA foram calculadas de acordo com as fórmulas: $(EBA/EBA+EBF) \times 100$ e $(TBA/TBA+TBF) \times 100$, respectivamente (PELLOW et al., 1985). O efeito ansiolítico ou ansiogênico foi definido pelo aumento ou diminuição, respectivamente, na proporção das EBA, relativo ao número total de entradas em ambos os braços, e no tempo de exploração naqueles braços, relativo ao tempo total experimental.

3.6.3. Teste do Nado forçado

Aparato: Os animais avaliados neste teste foram colocados em um cilindro Plexiglass (30 cm de diâmetro e 50 cm de altura), contendo 40 cm de volume de água a uma temperatura de 23 ± 1 °C por 5 min (Figura 7).

Fundamento: Um perfeito modelo experimental para uso com animais deve ser isomórfico às condições humanas e torna-se útil quando pode ser mostrado que tem uma analogia relevante, ou seja, quando ele revela alguns aspectos de um processo complexo, por meio de hipóteses testadas em humanos (MCBRIDE et

al., 1998). Existem duas teorias que envolvem o uso desse teste: uma voltada para avaliação de estresse e outra envolvendo o estado de imobilidade dos animais, que podem representar apatia, caracterizando o estado de depressão. As duas podem ser avaliadas por meio desse modelo, tendo em vista que as reações de fuga e luta são bem caracterizadas (KIRBY e LUCKI, 1998; REDROBE et al., 1998). Este modelo é o mais amplamente utilizado para avaliação farmacológica de atividade antidepressiva (PORSOLT et al., 1977).



Figura 7: Aparato utilizado para o Teste do Nado forçado, realizado em um tempo total de 5 min, onde os 2 primeiros minutos são considerados para habituação.

Procedimentos experimentais: Os ratos exibiram dois tipos de comportamentos em um tempo de 5 min: *fuga*, que foi observada nos primeiros dois minutos; e *imobilidade contínua* nos três últimos minutos (permanecer flutuando, mantendo somente os movimentos mínimos necessários para manter a cabeça fora da água). Os dois minutos iniciais (fuga) foram considerados para habituação ao teste. O tempo da imobilidade foi definido como indicativo de comportamento relacionado à depressão (LUCENA et al., 2010)

3.6.4 Esquiva inibitória do tipo *step-down*

Aparato: O aparelho de esquiva (EP-104 INSIGHT) consiste em uma caixa de vidro e metal medindo 50 x 25 x 25 cm com uma plataforma de 5 cm de altura, 8 cm de largura e 25 cm comprimento. No canto esquerdo apresenta uma série de barras de alumínio, distribuídas com uma distância de 1 cm entre si, que constitui

o assoalho da caixa, conectadas a um estimulador elétrico (Figura 8).

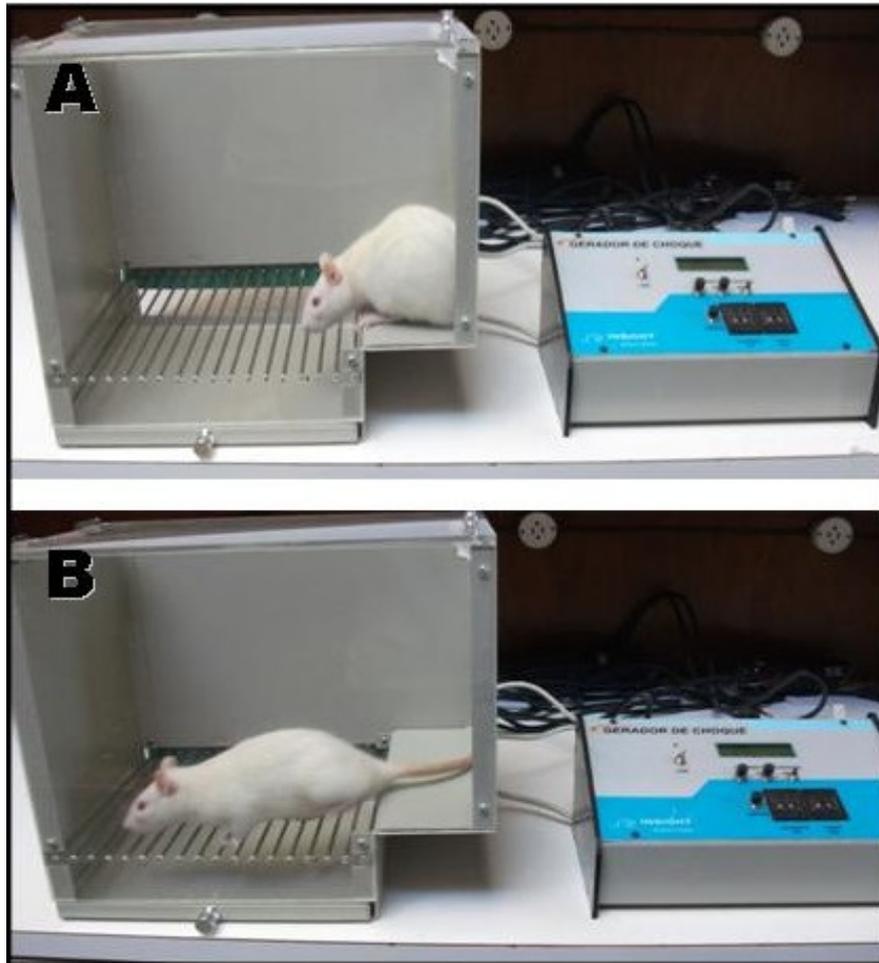


Figura 8 – Esquiva inibitória do tipo *step-down* usada para avaliar a memória de curta e longa duração em rato durante um período de 3 min.

Fundamento: A medida da latência avaliada no teste da esquiva inibitória do tipo *step-down* tem sido um dos modelos experimentais usado por muitos laboratórios na avaliação dos estudos envolvendo aprendizagem e memória (LUCENA et al., 2013). Para tal, os parâmetros de avaliação envolvem uma fase de treino e pós-treino e um choque de baixa intensidade, que serve de estímulo aversivo para que o animal deixe de executar uma determinada tarefa que foi a ele apresentada. Esse procedimento deve ser lembrado quando da realização de um teste proposto, como mecanismo de retenção da memória.

Procedimento experimental: As etapas apresentadas a seguir são padronizadas na área de investigação de memória para este teste específico.

- No primeiro dia da análise, os animais foram habituados ao aparato, permanecendo no interior do mesmo por 3 min.
- No segundo dia, os animais foram cuidadosamente colocados na plataforma em frente ao canto esquerdo da caixa de treino, com a face virada para o lado oposto ao do observador, podendo mudar de posições após ser solto da contenção (Fig 8A). Assim que o animal desceu da plataforma (Fig. 8B) e colocou as quatro patas na grade recebeu um choque de 0,4 mA por 1 seg, sendo retirado imediatamente da caixa de treino. A memória de curta duração (MCD) foi investigada 1 h após o treino. No teste, o tempo (latência) máximo de 3 min (180 seg) em que os animais levaram para descer com as quatro patas da plataforma foi utilizado como indicativo de retenção de memória.
- No terceiro dia, os animais foram novamente colocados cuidadosamente na plataforma em frente ao canto esquerdo da caixa de treino. A memória de longa duração (MLD) foi avaliada 24h após o treino. Da mesma forma que na MCD, o tempo (latência) máximo de 3 min (180 seg.) em que os animais levaram para descer com as quatro patas da plataforma foi utilizado como indicativo de retenção de memória.

Após observar cada animal nos testes, os aparatos eram limpos com álcool 10% (v/v) para evitar que o odor do rato recém-testado interferisse no comportamento dos demais a serem testados.

3.6.5. Resumo do Desenho Experimental

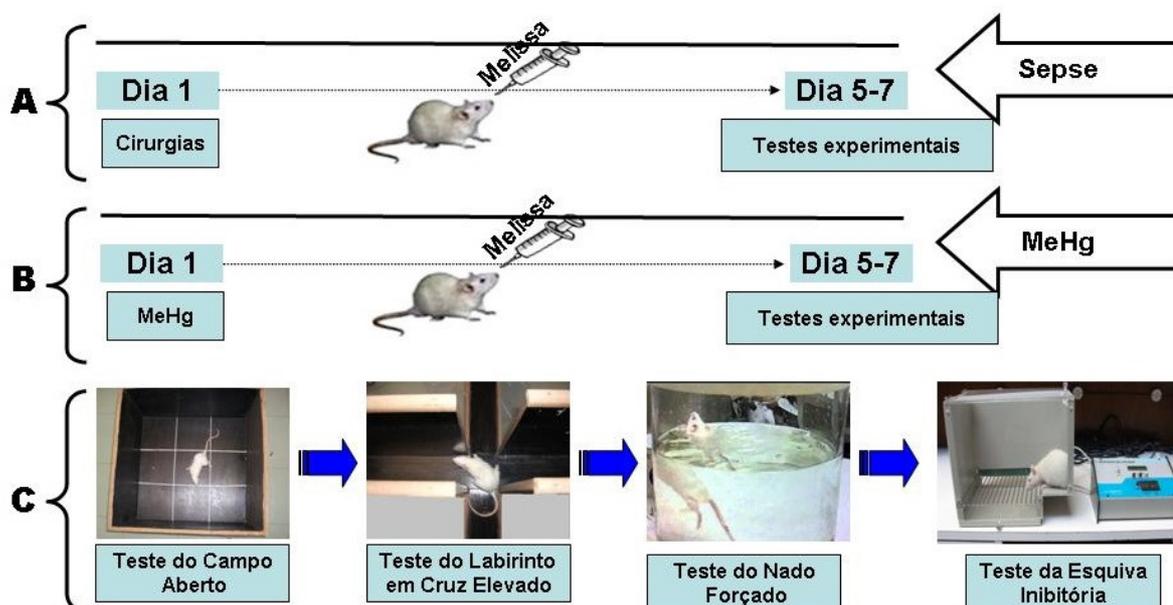


Figura 9: Delineamento dos procedimentos experimentais. A) Administração da *M.officinalis* (100 mg/kg, v.o.) durante uma semana após os procedimentos cirúrgicos; e B) durante uma semana após a administração do metilmercúrio (100 mg/kg, v.o.); seguida da C) avaliação nos testes experimentais, locomoção (Teste do campo aberto), ansiedade (Teste do labirinto em cruz elevado), depressão (Teste do nado forçado) e memória (Teste da esquiva inibitória *step-down*), após 1 h da última administração.

3.7 Análises estatísticas

Os dados foram expressos como a média \pm erro padrão da média (e.p.m.) de 10 animais por grupo. As comparações estatísticas foram realizadas pela Análise de Variância (ANOVA) de uma via e os grupos comparados entre si pelo teste *post-hoc* de Newman-Keuls. A probabilidade indicativa de diferença estatisticamente significativa foi de $p \leq 0,05$. Para tal, foi utilizado o software GraphPad Prism, v. 5.01®, 2010 (San Diego, CA).

4. RESULTADOS

4.1 SEPSE INDUZIDA EXPERIMENTALMENTE

4.1.1 Teste do campo Aberto

Considerando o número de quadrantes percorridos no campo aberto durante o período de 5 minutos não se observou qualquer alteração entre os grupos (Fig. 10).

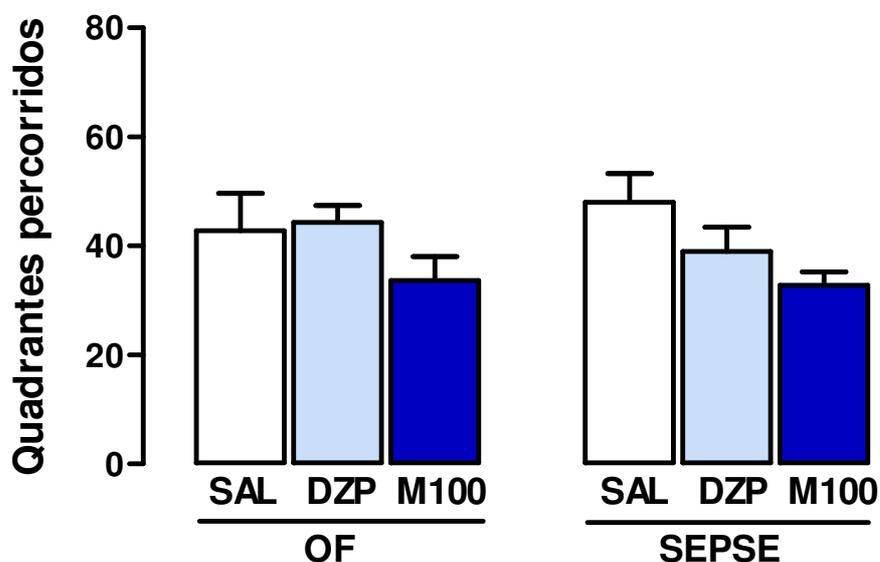


Figura 10 – Efeitos da administração oral subcrônica de salina (SAL), diazepam (DZP – 1 mg/kg) e extrato etanólico de *Melissa officinalis* (100 mg/kg) em animais que passaram por procedimentos cirúrgicos, com ou sem indução de sepse. A avaliação foi realizada no teste do campo aberto por um período de 5 minutos. Cada barra representa a média \pm e.p.m de 10 animais por grupo.

4.1.2 Teste do labirinto em Cruz Elevado

. No LCE, os animais do grupo OF que foram administrados com *M. officinalis* aumentaram a % entradas nos braços abertos – fig. 11A: [$F_{(5,59)} = 5,00$; $p < 0,05$] e a % tempo nos braços abertos – fig. 11B: [$F_{(5,59)} = 4,20$; $p < 0,05$], similar aos animais tratados com DZP: % entradas nos braços abertos – fig. 11A: [$F_{(5,59)} = 5,06$; $p < 0,05$] e % tempo nos braços abertos – fig. 11B: [$F_{(5,59)} = 4,91$; $p < 0,05$]. Nos animais que sobreviveram à sepse e receberam o extrato de *M. officinalis*, observou-se um aumento na % entradas nos braços abertos – fig. 11A: [$F_{(5,59)} = 5,91$; $p < 0,05$] e na % tempo nos braços abertos – fig. 11B: [$F_{(5,59)} = 5,07$; $p < 0,05$],

similar aos animais tratados com DZP: % entrada nos braços abertos – fig. 11A: [$F_{(5,59)} = 5,96$; $p < 0,05$] e % tempo nos braços abertos – fig. 11B: [$F_{(5,59)} = 5,00$; $p < 0,05$]. A frequência nos braços fechados não foi afetada pelos tratamentos permanecendo constante entre os grupos (fig. 11C).

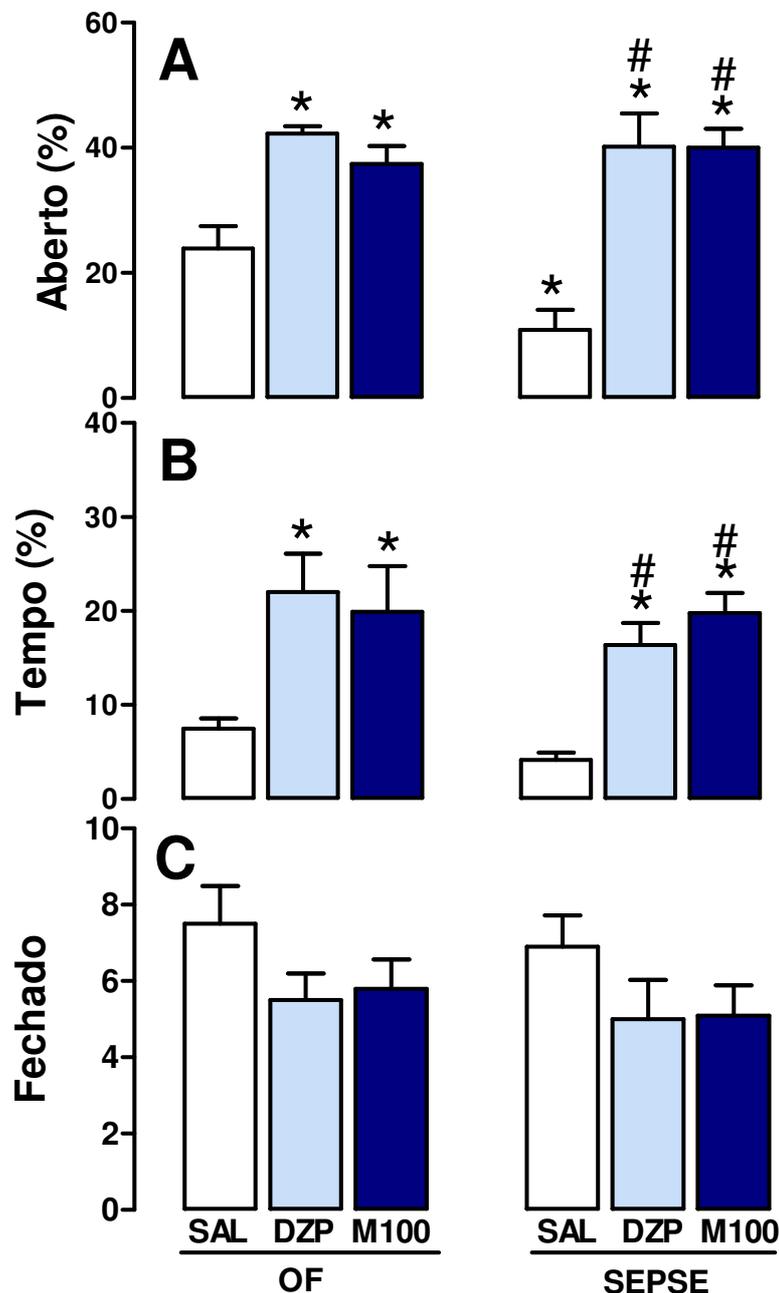


Figura 11 – Efeitos da administração oral subcrônica de salina (SAL), diazepam (DZP – 1 mg/kg) e extrato etanólico de *Melissa officinalis* (100 mg/kg) em animais que passaram por procedimentos cirúrgicos, com ou sem indução de sepse. A) Representa % entradas nos braços abertos, B) Representa % tempo nos braços abertos, e C) Representa a frequência nos braços fechados. * $p \leq 0.05$ significa diferença estatística em relação ao controle OF tratado com SAL; # $p \leq 0.05$ significa diferença estatística em relação aos animais que sobreviveram a sepse. A avaliação foi realizada no teste do LCE por um período de 5 minutos. Cada barra representa a média \pm e.p.m de 10 animais por grupo (ANOVA, Teste de Newman Keuls).

4.1.3 Teste do Nado Forçado

Conforme demonstrado na Fig. 12, o tratamento com FXT foi capaz de reduzir o tempo de imobilidade nos animais do grupo OF ($[F_{(5,59)} = 3,96; p < 0,05]$) e dos ratos que sobreviveram a sepse ($[F_{(5,59)} = 3,21; p < 0,05]$) comparado ao grupo controle OF tratado com SAL. A *M. officinalis*, por sua vez, reduziu o tempo de imobilidade nos ratos que sobreviveram a sepse ($[F_{(5,59)} = 5,37; p < 0,05]$).

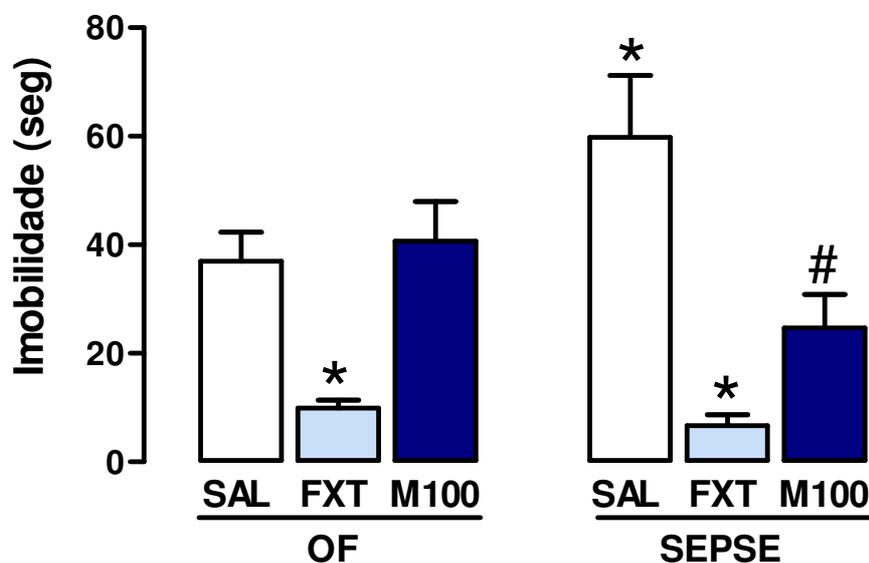


Figura 12 – Efeitos da administração oral subcrônica de salina (SAL), fluoxetina (FXT) e extrato etanólico de *Melissa officinalis* (100 mg/kg) em animais que passaram por procedimentos cirúrgicos, com ou sem indução de sepse. * $p \leq 0,05$ significa diferença estatística em relação ao controle OF tratado com SAL; # $p \leq 0,05$ significa diferença estatística em relação aos animais que sobreviveram à sepse. A avaliação foi realizada no teste do Nado Forçado por um período de 3 minutos. Cada barra representa a média \pm e.p.m de 10 animais por grupo (ANOVA, Teste de Newman Keuls).

4.1.4 Teste da Esquiva Inibitória

Conforme visualizado na fig. 13, a *M. officinalis* interferiu, de forma positiva, nos efeitos facilitatórios da memória em animais que sobreviveram a sepse, quando avaliados após 1 hora (MCD) e 24 horas (MLD) da última administração do extrato (100 mg/kg).

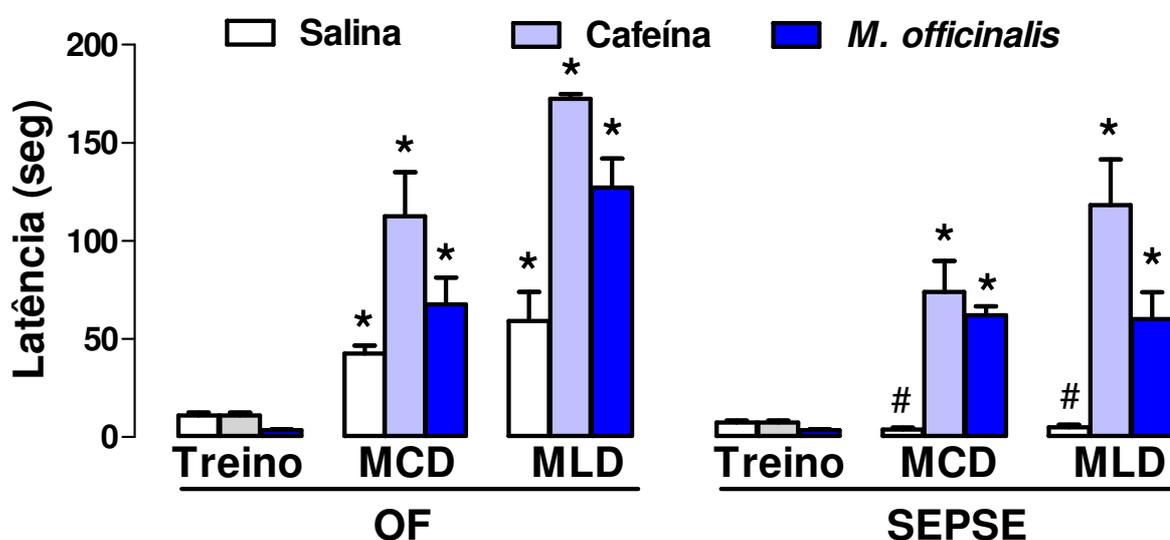


Figura 13 – Efeitos da administração oral subcrônica de salina (SAL), cafeína (CAF - 10 mg/kg) e extrato etanólico de *Melissa officinalis* (100 mg/kg) em animais que passaram por procedimentos cirúrgicos, com ou sem indução de sepse. * $p \leq 0.05$ significa diferença estatística em relação às etapas de Treino dos animais conforme cada grupo experimental (OF ou sepse). # $p \leq 0.05$ significa diferença estatística em relação aos respectivos animais controles MCD e MLD no grupo OF que receberam salina. A avaliação foi realizada no teste da Esquiva Inibitória por um período de 3 minutos. Cada barra representa a média \pm e.p.m de 10 animais por grupo (ANOVA, teste de Newman Keuls). MCD = memória de curta duração, MLD= memória de longa duração.

4.2 INTOXICAÇÃO POR MeHg

4.2.1 Teste do Campo aberto

Considerando o número de quadrantes percorridos no campo aberto durante o período de 5 minutos não se observou qualquer alteração entre os grupos quando avaliados em comparação ao controle tratado com salina (Fig. 14).

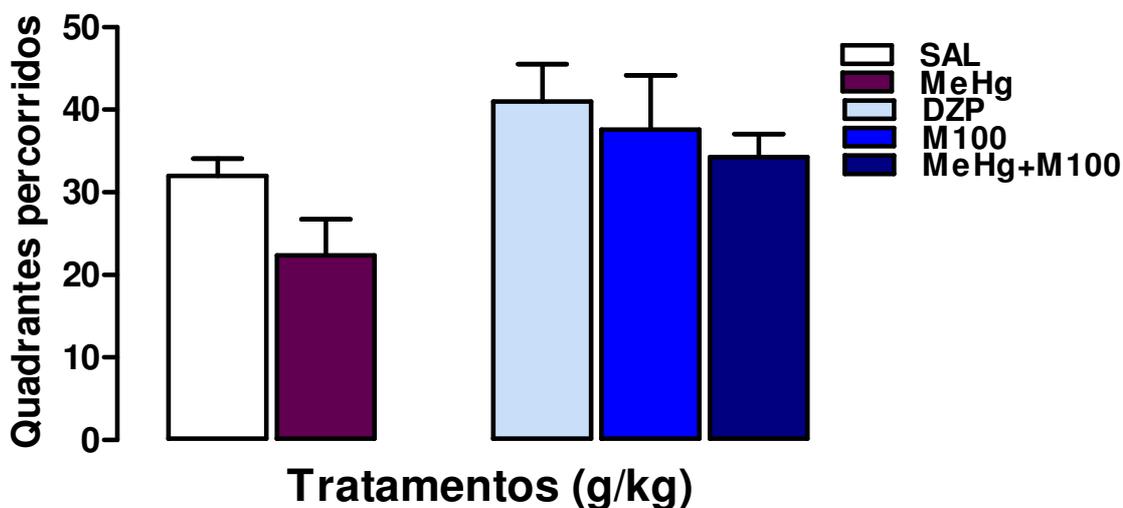


Figura 14 – Efeitos da administração oral subcrônica de salina (SAL), diazepam (DZP 1 mg/kg) e extrato etanólico de *Melissa officinalis* (100 mg/kg = M100) em animais que receberam SAL ou metilmercúrio (MeHg - 100 mg/kg). O DZP foi usado como controle positivo. A avaliação foi realizada no teste do campo aberto por um período de 5 minutos. Cada barra representa a média ± e.p.m de 10 animais por grupo.

4.2.2 Teste do labirinto em Cruz Elevado

No LCE, os animais administrados com MeHg reduziram o %TBA em comparação com os controles tratados com salina. O extrato de *M. officinalis* impediu essa resposta, com um efeito similar aos animais tratados com DZP (Fig. 15).

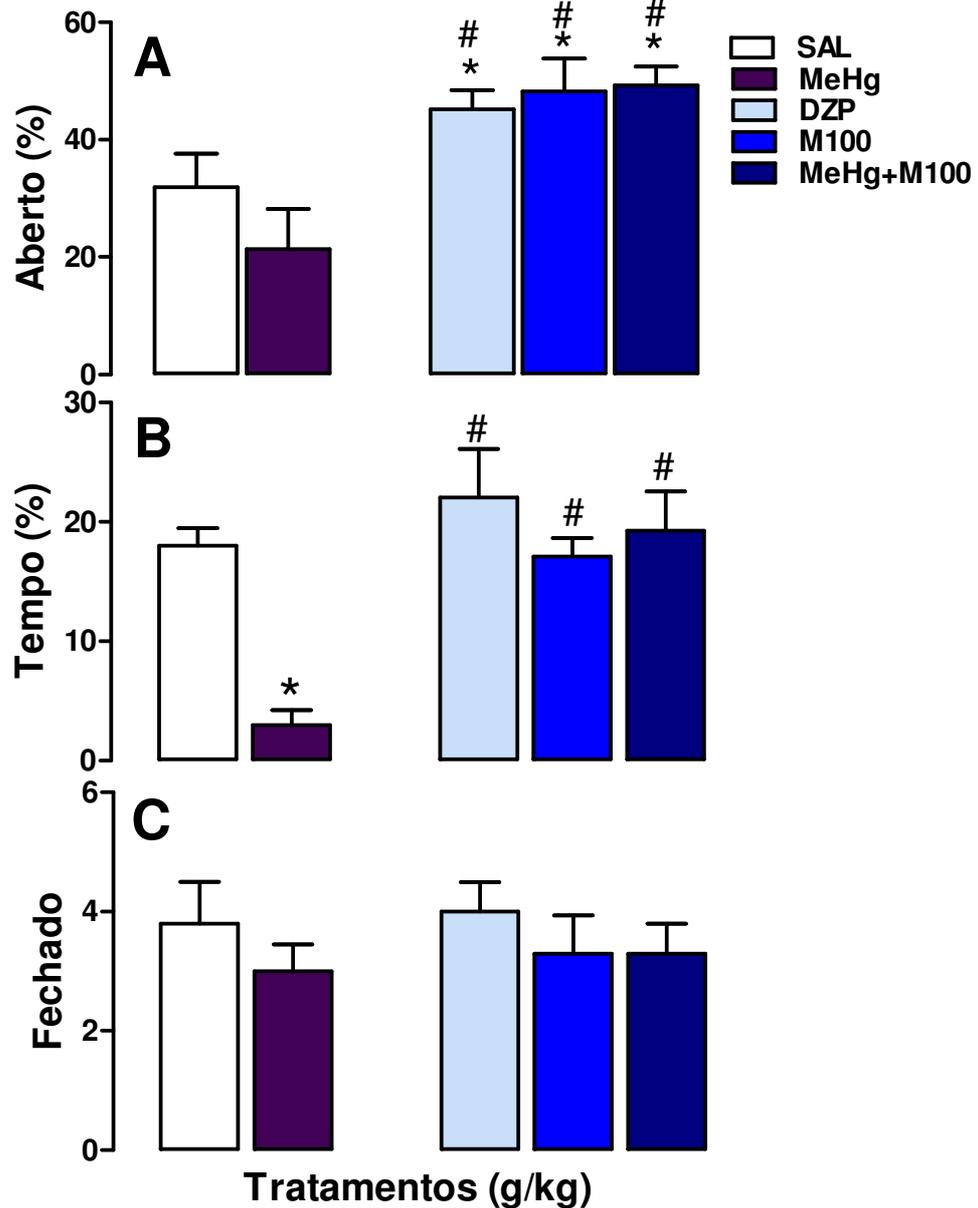


Figura 15 – Efeitos da administração oral subcrônica de salina (SAL), diazepam (DZP 1 mg/kg) e extrato etanólico de *Melissa officinalis* (100 mg/kg = M100) em animais que receberam SAL ou metilmercúrio (MeHg - 100 mg/kg). A) Representa % entradas nos braços abertos, B) % tempo nos braços abertos, e C) frequência nos braços fechados. * $p \leq 0.05$ significa diferença estatística em relação aos controles tratados com SAL; # $p \leq 0.05$ significa diferença estatística em relação aos animais expostos ao MeHg A avaliação foi realizada no teste do LCE por um período de 5 minutos. Cada barra representa a média \pm e.p.m de 10 animais por grupo (ANOVA, Teste de Newman Keuls).

4.2.3 Teste do Nado Forçado

A ANOVA de uma via mostrou diferença estatística entre os grupos [$F_{(4,49)}=24,61$; $p=0,0001$], de tal forma que a diferença estatística apontou significância do grupo de MeHg em relação ao controle tratado com SAL, demonstrado pelo aumento do tempo de imobilidade no teste do nado forçado. A FXT e o extrato de Melissa foram capazes de reduzir o tempo de imobilidade *per se*, mas não foi eficaz diante a associação (Fig. 16).

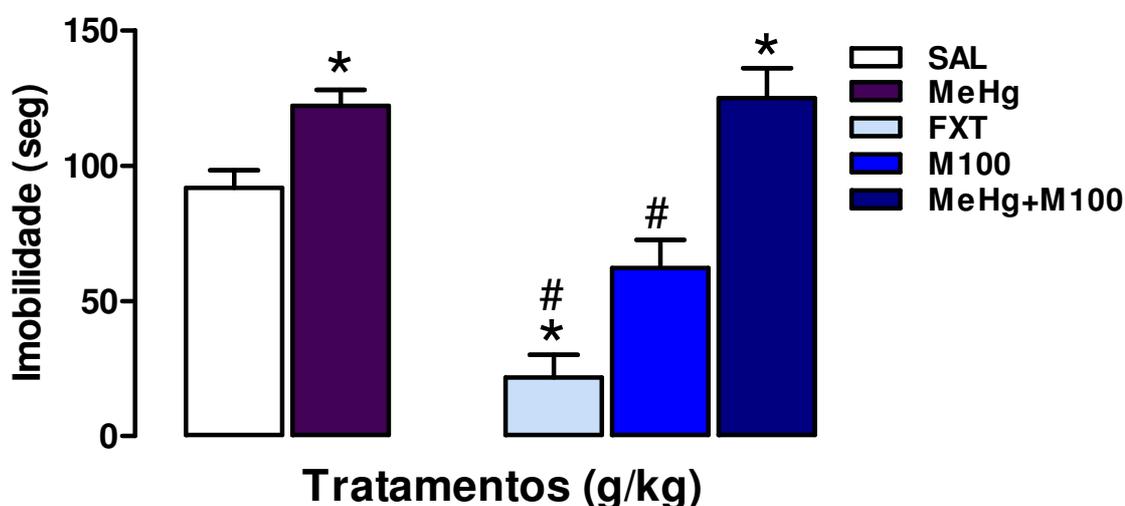


Figura 16 – Efeitos da administração oral subcrônica de salina (SAL), fluoxetina (FXT = 10 mg/kg) e extrato etanólico de *Melissa officinalis* (100 mg/kg = M100) em animais que receberam SAL ou metilmercúrio (MeHg - 100 mg/kg). * $p \leq 0,05$ significa diferença estatística em relação aos controles tratados com SAL; # $p \leq 0,05$ significa diferença estatística em relação aos animais expostos ao MeHg. A avaliação foi realizada no teste do Nado Forçado por um período de 3 minutos. Cada barra representa a média \pm e.p.m de 10 animais por grupo. (ANOVA, Teste de Newman Keuls).

4.2.4 Teste da Esquiva Inibitória

Na avaliação da MCD e MLD (Fig. 17), a CAF mostrou um nítido efeito mnemônico quando comparado aos controles intragrupos e intergrupos ($p < 0,05$). O extrato de *Melissa officinalis per se* também melhorou a MLD ($p < 0,05$), mas não interferiu na MCD. Nenhuma alteração foi observada quando esse extrato foi administrado nos animais expostos ao MeHg ($p > 0,05$).

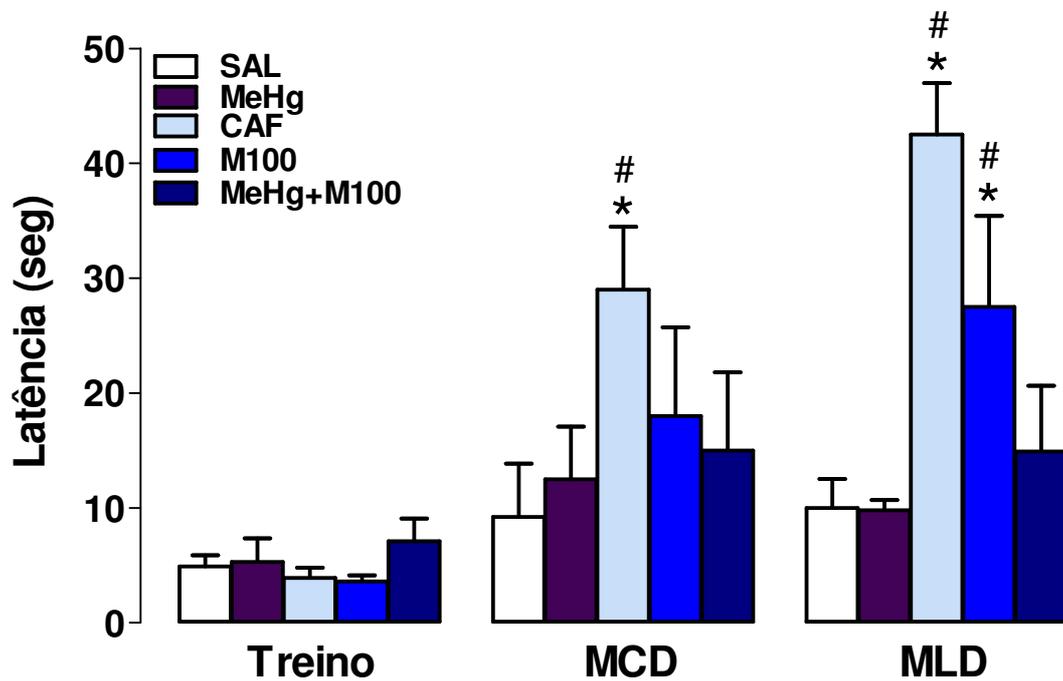


Figura 17 - Efeitos da administração oral subcrônica de salina (SAL), cafeína (CAF = 10 mg/kg) e extrato etanólico de *Melissa officinalis* (100 mg/kg = M100) em animais que receberam SAL ou metilmercúrio (MeHg - 100 mg/kg).. * $p \leq 0.05$ significa diferença estatística em relação aos controles intragrupos tratados com salina na MCD ou MLD; # $p \leq 0.05$ significa diferença estatística em relação aos respectivos animais controles na etapa de treino. A avaliação foi realizada no teste da Esquiva Inibitória por um período de 3 minutos. Cada barra representa a média \pm e.p.m de 10 animais por grupo (ANOVA, teste de Newman Keuls).

5. DISCUSSÃO

O extrato etanólico de *M. officinalis* foi eficaz em reduzir os níveis de ansiedade, depressão e déficits cognitivos produzidos pela sepse induzida experimentalmente em ratos e diante da neurotoxicidade induzida pelo MeHg. Esses resultados parecem ser independentes de efeito sedativo, tendo em vista que não houve qualquer interferência na locomoção dos animais quando avaliados no teste do campo aberto e também na frequência nos braços fechados do LCE. Na maioria das vezes, o extrato mostrou efeito similar aos controles positivos DZP (para ansiedade), FXT (para depressão) e CAF (para memória).

Fazendo uma analogia com o quadro de sepse que ocorre em humanos, nossos resultados mostraram que os ratos que sobreviveram à sepse manifestaram um comportamento sugestivo de ansiedade que foi observado pela redução no %EBA e no %TBA do LCE, caracterizando uma resposta ansiogênica. Quanto aos aspectos relacionados à depressão, os mesmos animais aumentaram o tempo de imobilidade no teste do nado forçado, o qual foi reduzido pela FXT. Resultados similares foram observados no grupo de animais tratados com MeHg. O extrato de *M. officinalis* manteve uma resposta similar aos animais controles.

A *M. officinalis* é conhecida por suas leves propriedades sedativas, ainda que administrada em uma única dose (SOULIMANI et al., 1991; WAKE et al., 2000). Entretanto, esses efeitos não foram observados em nossos animais, visto que não houve alteração locomotora na avaliação do teste do campo aberto e LCE. Cabe enfatizar que a dose usada na presente pesquisa é fruto de uma análise onde foi avaliada uma dose resposta do mesmo extrato de Melissa. Nesta dose, portanto, os animais não ficavam sedados (TAIWO et al., 2012).

Dessa forma, nossos achados corroboram com aqueles observados por outros pesquisadores (KENNEDY et al., 2006; TAIWO et al., 2012). Além disso, observa-se que os dados apresentados reforçam o fato de que roedores normalmente exibem preferência pelos braços fechados e evitam os braços abertos do LCE (TREIT et al., 1993; TREIT e FUNDYTUS, 1998). Drogas ansiolíticas, como o DZP, modulam comportamentos de roedores no LCE, causando um aumento no %EBA e %TBA. Em decorrência disso, essas medidas

podem servir como indicador de atividade ansiolítica (ANSELONI e BRANDÃO, 1997).

Além disso, os nossos resultados também reforçam os dados prévios obtidos por nosso grupo de pesquisa mostrando resposta ansiogênica e depressiva em ratos sobreviventes à sepse tratado com antibiótico. Leite et al. (2013) observaram que a administração subcrônica de nicotina não alterou a taxa de sobrevivência de ratos submetidos aos procedimentos cirúrgicos de CLPC, além de sugerir novas evidências científicas da propriedade da nicotina na melhora dos prejuízos cognitivos de longa duração e resposta sugestiva de ansiedade. Tuon et al. (2007), por sua vez, demonstraram nos mesmos protocolos um aumento significativo no tempo comparado aos ratos controles OF. A imipramina, um dos fármacos antidepressivos mais consumidos pela população humana, foi capaz de reduzir os parâmetros avaliados sem qualquer alteração na locomoção. Em nossos experimentos a FXT, um inibidor seletivo de recaptção de serotonina, mostrou efeito similar aos observados com a imipramina.

A gravidade dessas doenças comportamentais parece se agravar na presença de comorbidade, que podem levar a necessidade de intervenções na saúde mental, isto porque a ansiedade pode representar um fator de risco causal para desenvolver a depressão (FLANNERY-SCHROEDER, 2006). O aparecimento de transtornos de ansiedade geralmente ocorre na infância ou adolescência, enquanto os depressivos tendem a ter seu início na adolescência, se agravando na fase adulta (ROZA et al., 2003; SCHATZBERG et al., 1998).

Acerca dos aspectos cognitivos, os animais que sobreviveram à sepse apresentaram um prejuízo na memória, que foi caracterizado pela diminuição no tempo de permanência na plataforma da esQUIVA inibitória. A administração do extrato de *M. officinalis* aumentou o tempo de permanência na plataforma, comportamento característico de retenção de memória.

Atualmente, vários estudos tem mostrado a importância de fitoterapia no tratamento de disfunções comportamentais e cognitivas em humanos (ADAMS et al., 2007; AKHONDZADEH et al., 2003; GIORGETTI et al., 2007; KENNEDY et al., 2002), ainda que haja restrição de informações sobre as possíveis propriedades

farmacodinâmicas envolvidas com os seus efeitos farmacológicos. No caso da *M. officinalis* há fortes evidências de que suas propriedades terapêuticas devem-se aos seus componentes ativos que têm sido identificados como os aldeídos monoterpênicos, glicosídeos monoterpênicos, flavonóides e constituintes polifenólicos (CARNAT et al., 1998; GUGINSKI et al., 2009).

Na sepse induzida experimentalmente, é importante se avaliar mediadores inflamatórios para que, dessa forma, uma melhor caracterização dos resultados comportamentais possa ser considerada. No que se refere ao MeHg, um paradigma importante é dosar os seus níveis no sangue e no cérebro durante o acompanhamento do protocolo da exposição, bem como na medida em que esses níveis são fisiologicamente relevantes na exposição humana descritas na literatura. A concentração de mercúrio no sangue e cérebro pode ser usada como biomarcador de sua exposição e permite uma comparação dos efeitos adversos em espécies diferentes (ROONEY, 2014). Em nossos experimentos não foram realizadas essas observações.

Há uma diversidade de fatores que pode vincular a ação dos neuropeptídeos na fisiopatologia do choque séptico, incluindo a geração local de mediadores pró-inflamatórios, microcirculação prejudicada, desequilíbrio de neurotransmissores e impacto sobre a falha no órgão periférico. Alterações no fluxo sanguíneo cerebral, liberação de moléculas inflamatórias e alterações metabólicas contribuem para a disfunção neuronal e morte celular (PINHEIRO et al., 2013; SEMMLER et al., 2008). Esses neuropeptídeos, entretanto, também não foram pautas de nossos estudos.

Diante do exposto, observa-se um progresso considerável nas descobertas científicas envolvendo alguns fitoterápicos que podem auxiliar no melhoramento dos processos cognitivos e comportamentais em paciente com diferentes prejuízos neurológicos. A natureza dispõe de fontes naturais para vários tipos de tratamento, oferecendo produtos com efeitos antimicrobianos para tratar infecções causadas por bactérias, vírus e fungos, enquanto que oferece suporte terapêutico para múltiplos órgãos e sistemas fisiológicos, assim como biofármacos com ação ansiolítica, antidepressiva e na melhora mnemônica. Embora haja uma variedade

de drogas para tratar as infecções microbianas é importante considerar a frequência e gravidade dos efeitos adversos.

Entretanto, mesmo diante de opções diversificadas de antimicrobianos, considerando suas toxicidades e grande incidência de resistência bacteriana, se faz necessária a descoberta de novas alternativas em busca de novos fármacos com menos toxicidade, com baixos custos e acessíveis a toda população. Os componentes ativos de extrato de *M. officinalis*, por exemplo, podem constituir possíveis investimentos feitos pelas companhias farmacêuticas para tratar as complicações clínicas decorrentes de disfunções neurológicas, ficando aqui o nosso interesse nessas investigações de uma forma mais aprofundada.

6. CONCLUSÕES

Nos animais que sobreviveram à sepse induzida experimentalmente ou administrados com MeHg, o extrato de *M. officinalis* foi eficaz na redução dos níveis de ansiedade, depressão e déficits cognitivos, sem qualquer interferência nas atividades locomotoras dos animais. Tais observações foram consideradas, baseando-se nas seguintes observações:

Sepse induzida experimentalmente ou administração com MeHg:

1. Os animais que sobreviveram à sepse tratados com antibióticos ou quando administrados com MeHg apresentaram diminuição nas %EBA e/ou %TBA do LCE. Essa resposta ansiogênica ocorreu sem afetar a locomoção, visto que a EBF no LCE não foram afetadas.
2. Os mesmos animais apresentaram comportamento sugestivo de depressão, quando avaliados no teste do Nado forçado, que foi caracterizado por um aumento no tempo de imobilidade.
3. A sepse induzida experimentalmente nos animais tratados com antibióticos apresentou déficits cognitivos no teste da Esquiva inibitória do tipo *step down*, o que pode ser observado pela redução no tempo de latência na plataforma do aparato. Respostas similares foram observadas mediante a administração com MeHg.

Aplicabilidade do extrato de *M. officinalis*

1. O extrato de *M. officinalis* impediu a resposta ansiogênica decorrente da sepse induzida experimentalmente e da administração com MeHg, quando elevou os %EBA e %TBA do LCE, mantendo uma resposta similar aos animais controles, sem alterar a locomoção e as EBF do LCE
2. O efeito sugestivo de depressão em ratos sobreviventes à sepse e tratados com antibióticos ou naqueles administrados com o MeHg, caracterizado pelo aumento no tempo de imobilidade, foi bloqueado pelo extrato de *M. officinalis*, mantendo uma resposta similar aos animais controles.

3. O extrato de *M. officinalis* favoreceu um aumento no tempo de permanência dos animais na plataforma da esQUIVA inibitória, principalmente no grupo da sepse induzida experimentalmente.

Em um contexto geral, os achados deste estudo demonstraram que o extrato de *M. officinallis* pode prevenir as alterações comportamentais e cognitivas resultantes da sepse experimental e a exposição ao MeHg, cabendo investigar os possíveis mecanismos celulares e moleculares envolvidos com as respostas dessa terapia natural.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adams M, Gmünder F, Hamburger M. Plants traditionally used in age related brain disorders - A survey of ethnobotanical literature. *J Ethnopharmacol*, 113: 363-381, 2007.

Akhondzadeh S, Noroozian M, Mohammadi M, Ohadinia S, Jamshidi AH, Khani M. *Salvia officinalis* extract in the treatment of patients with mild to moderate Alzheimer's disease: a double blind, randomized and placebo-controlled trial. *J Clin Pharm Ther*, 28: 53-59, 2003.

Alnamer R, Alaoui K, Boudida HE, Benjouad A, Cherrah Y. Psychostimulants activity of *Rosmarinus officinalis* L. methanolic and aqueous extracts. *J Med Plants Res*, 6: 1860-1865, 2012.

Amin-Zaki L, Majeed MA, Elhassani SB, Clarkson TW, Greenwood MR, Doherty RA. Prenatal methylmercury poisoning. Clinical observations over five years. *Am J Dis Child*, 133: 172-177, 1979.

Angus DC, Zwirble LWT, Lidecker J, Clermont G, Carcillo J, Pinsky MR. Epidemiology of severe sepsis in the United states: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med*, 29: 1303-1310, 2001.

Anseloni VZ, Brandão ML. Ethopharmacological of behavior of rats using variations of the elevated plus-maze. *Behav Pharmacol*, 8: 533-540, 1997.

Aschner M, Syversen T. Methylmercury: recent advances in the understanding of its neurotoxicity. *Ther Drug Monit*, 27: 278-283, 2005.

Bayat M, Azami Tameh A, Hossein Ghahremani M, Akbari M, Mehr SE, Khanavi M, Hassanzadeh G. Neuroprotective properties of *Melissa officinalis* after hypoxic-ischemic injury both in vitro and in vivo. *Daru*, 20: 42, 2012.

Bensefa-Colas L, Andujar P, Descatha A. Mercury poisoning. *Rev Med Interne*. 32: 416-424, 2011.

Bent S. Herbal medicine in the United States: review of efficacy, safety, and regulation: grand rounds at University of California, San Francisco Medical Center. *J Gen Intern Med*, 23: 854-859, 2008.

Bisen-Hersh EB, Farina M, Barbosa F Jr, Rocha JB, Ascher M. Behavioral effects of developmental methylmercury drinking water exposure in rodents. *J Trace Elem Med Biol*, S0946-672x: 00158-2, 2013.

Bone RC, Balk RA, Cerra FB. Definitions for sepsis and organs failure and guidelines for the use of inovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/ Society of Critical Care Medicine. *Chest*, 101:1644-1655, 1992.

Bounihi A, Hajjaj G, Alnamer R, Cherrah Y, Zellou A. In Vivo Potential Anti-Inflammatory Activity of *Melissa officinalis* L. Essential Oil. *Adv Pharmacol Sci*, 2013: 1-7, 2013.

Bourin M, Bougerol T, Guitton B, Broutin E. A combination of plant extracts in the treatment of outpatients with adjustment disorder with anxious mood: controlled study versus placebo. *Fundam Clin Pharmacol*, 11:127–132, 1997.

Burbacher TM, Rodier PM, Weiss B. Methylmercury developmental neurotoxicity: A comparison of effects in humans and animals. *Neurotoxicol Teratol*, 12: 191-202, 1990.

Cagiano R, De Salvia MA, Renna G, Tortella E, Braghiroli D, Parenti D, Zanolli P, Baraldi M, Annau Z, Cuomo V. Evidence that exposure to methyl mercury during gestation induces behavioral and neurochemical changes in offspring of rats. *Neurotoxicol Teratol*, 12: 23–28, 1990.

Carnat AP, Carnat A, Fraise D, Lamaison JL. The aromatic and polyphenolic composition of lemon balm (*Melissa officinalis* L. subsp. *officinalis*) tea. *Pharm Acta Helv*, 72: 301-305, 1998.

Carta P, Flore C, Alinovi R, Ibba A, Tocco MG, Aru G, Carta R, Girei E, Mutti A, Lucchini R, Randaccio FS. Sub-clinical neurobehavioral abnormalities associated with low level of mercury exposure through fish consumption. *Neurotoxicology*, 24: 617–623, 2003.

Carvalho CM, Lu J, Zhang X, Arner ES, Holmgren A. Effects of selenite and chelating agents on mammalian thioredoxin reductase inhibited by mercury: implications for treatment of mercury poisoning. *FASEB J*, 1:370–381, 2011.

Cases J, Ibarra A, Feuillère N, Roller M, Sukkar SG. Pilot trial of *Melissa officinalis* leaf extract in the treatment of volunteers suffering from mild-to-moderate anxiety disorders and sleep disturbances. *Med J Nutrition Metab*, 4: 211-218, 2011.

Cheng J, Fujimura M, Zhao W, Wang W. Neurobehavioral effects, c-Fos/Jun expression and tissue distribution in rat offspring prenatally co-exposed to MeHg and PFOA: PFOA impairs Hg retention. *Chemosphere*, 91: 758–764, 2013.

Choi J, Kim TH, Choi TY, Lee MS. Ginseng for health care: a systematic review of randomized controlled trials in Korean literature. *PLoS One*.8: e59978, 2013.

Clarkson TW, Magos L, Myers GJ. The toxicology of mercury—current exposures and clinical manifestations. *N Engl J Med*, 18: 1731–1737, 2003.

Clarkson TW, Magos L. The toxicology of mercury and its chemical compounds. *Crit Rev Toxicol*, 36: 609–662, 2006.

Compeau GC, Bartha R. Sulfate-reducing bacteria: principal methylators of mercury in anoxic estuarine sediment. *Appl Environ Microbiol*, 2:498–502, 1985.

Crespo-López ME, De Sá AL, Herculano AM, Burbano RR, Do Nascimento JLM. Methylmercury genotoxicity: a novel effect in human cell lines of the central nervous system. *Environ Int*, 33:141–146, 2007.

Dalla Corte CL, Wagner C, Sudati JH, Comparsi B, Leite GO, Busanello A, Soares FA, Aschener M, Rocha JB. Effects of diphenyl diselenide on methylmercury toxicology in rats. *Biomed Res Int*, 2013: 983821, 2013

Davidson PW, Myers GJ, Weiss B. Mercury exposure and child development outcomes. *Pediatrics*, 4:1023-1029, 2004.

Dellinger RP, Levy MM, Rhodes A, Annane D, Gerlach H, Opal SM, Sevransky JE, Sprung CL, Douglas IS, Jaeschke R, Osborn TM, Nunnally ME, Townsend SR, Reinhart K, Kleinpell RM, Angus DC, Deutschman CS, Machado FR, Rubenfeld

GD, Webb S, Beale RJ, Vincent JL, Moreno R. Surviving Sepsis Campaign Guidelines Committee including The Pediatric Subgroup. Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock, 2012, *Intensive Care Med*, 39: 165-228, 2013.

Dórea JG. Persistent, bioaccumulative and toxic substances in fish: human health considerations. *Sci Total Environ*, 400: 93–114, 2008.

Döring AS, Pellegrini E, Della Batola M, Nali C, Lorenzini G, Petersen M. How do background ozone concentrations affect the biosynthesis of rosmarinic acid in *Melissa officinalis*? *J Plant Physiol*, 171: 35-41, 2014.

Eccles CU, Annau Z. Prenatal methyl mercury exposure: I. Alterations in neonatal activity *Neurobehav Toxicol Teratol*, 4: 371–376, 1982.

Flannery-Schroeder EC. Reducing anxiety to prevent depression. *Am J Prev Med*, 6:136-142, 2006.

Fontes-Jr, EA, Souza PJ, Do Nascimento JL, Santos SN, Espíndola LS, Ferreira VM. Antinociceptive and Antiinflammatory Properties of the Ethanolic of *Pouperia ramifloral* Roots. *Lat Am J Pharm*, 28: 812-818, 2009.

Fujimura M, Cheng J, Zhao W. Perinatal exposure to low-dose methylmercury induces dysfunction of motor coordination with decreases in synaptophysin expression in the cerebellar granule cells of rats. *Brain Res*, 1464: 1–7, 2012.

Gaieski DF, Edwards JM, Kallan MJ, Carr BG. Benchmarking the incidence and mortality of severe sepsis in the United States. *Crit Care Med*, 41: 1167-1174, 2013.

Gardner A, Iverson GL, McCrory P. Chronic traumatic encephalopathy in sport: a systematic review. *Br J Sports Med*, 48: 84-90, 2014.

Gertz HJ, Kiefer M. Review about Ginkgo biloba special extract EGb 761 (Ginkgo). *Curr Pharm Des*, 10: 261-264, 2004.

Giorgetti M, Negri G, Rodrigues E. Brazilian plants with possible action on the central nervous system: a study of historical sources from the 16th to 19th century. *J Ethnopharmacol*, 109: 338-347, 2007.

Gochfeld M. Cases of mercury exposure, bioavailability, and absorption *Ecotoxicol Environ Saf*, 56: 174–179, 2003.

Goulet S, Doré FY, Mirault ME. Neurobehavioral changes in mice chronically exposed to methylmercury during fetal and early postnatal development. *Neurotoxicol Teratol*, 25: 335-347, 2003.

Grandjean P, Weihe P, White RF, Debes F, Araki S, Yokoyama K et al. Cognitive deficit in 7-year-old children with prenatal exposure to methylmercury. *Neurotoxicol Teratol*, 19: 417–428, 1997.

Grandjean P, Landrigan PJ. Developmental neurotoxicity of industrial chemicals. *Lancet*, 368: 2167–2178. 2006.

Grandjean P, Herz KT. Methylmercury and brain development: imprecision and underestimation of developmental neurotoxicity in humans. *Mount Sinai J Med*, 78: 107–118, 2011.

Grum DK, Kobal AB, Arneric N, Horvat M, Zonko B, Dzeroski S, Osredkar J. Personality traits in miners with past occupational elemental mercury exposure. *Environ Health Perspect* , 114: 290-296, 2006.

Guginski G, Luiz AP, Silva MD, Massaro M, Martins DF, Chaves J, Mattos RW, Silveira D, Ferreira VM, Calixto JB, Santos AR. Mechanisms involved in the antinociception caused by ethanolic extract obtained from the leaves of *Melissa officinalis* (lemon balm) in mice. *Pharmacol Biochem Behav*, 93: 10-16, 2009.

Handley SL, Mithani S. Effects of alpha-adrenoreceptor agonists in a maze-exploration model of “fear”-motivated behaviour. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 327: 1-5, 1984.

Harada M. Minamata disease: Methylmercury poisoning in Japan caused by environmental pollution. *Crit Rev Toxicol*, 25: 1-24, 1995.

Heinrich M, Teoh HL. Galanthamine from snowdrop—the development of a modern drug against Alzheimer's disease from local Caucasian knowledge. *J Ethnopharmacol*, 92:147–162, 2004.

Heinrich M, Modarai M, Kortenkamp A. Herbal extracts used for upper respiratory tract infections: are there clinically relevant interactions with the cytochrome P450 enzyme system? *Planta Med*, 74: 657-660, 2008.

Herculano AM, Crespo-López MC, Lima SM, Picanço-Dini DL, Do Nascimento JL. Methylmercury intoxication induces nitric oxide synthase activation in retinal cell culture. *Braz J Med Biol Res*, 39: 411–414, 2006.

Hutchins NA, Unsinger J, Hotchkiss RS, Ayala A. The new normal: immunomodulatory agents against sepsis immune suppression. *Trends Mol Med*, 20: 224-233, 2014.

Julvez J, Yorifuji T, Choi AL, Grandjean P. Epidemiological evidence on methylmercury neurotoxicity. In: Ceccatelli S Aschner M, editors. *Methylmercury and neurotoxicity*. New York: Springer: 13-35, 2012.

Kennedy DO, Scholey AB, Tildesley NTJ, Perry EK, Wesnes KA. Modulation of mood and cognitive performance following acute administration of *Melissa officinalis* (lemon balm). *Pharmacol Biochem Behav*, 72:953–964, 2002.

Kennedy DO, Little W, Scholey AB. Attenuation of laboratory-induced stress in humans after acute administration of *Melissa officinalis* (Lemon Balm). *Psychosom Med*, 66: 607-613, 2004.

Kennedy DO, Little W, Haskell CF, Scholey AB. Anxiolytic effects of a combination of *Melissa officinalis* and *Valeriana officinalis* during laboratory induced stress. *Phytother Res*, 20: 96-102, 2006.

Kennedy DO, Wightman EL. Herbal Extracts and Phytochemicals: Plant Secondary Metabolites and the Enhancement of Human Brain Function. *Adv Nutr*, 2: 32–50, 2011.

King EG, Bauzá GJ, Mella JR, Remick DG. Pathophysiologic mechanisms in septic shock. *Lab Invest*, 94: 4-12, 2014.

Kirby LG, Lucki I. The effect of repeated exposure to forced swimming on extracellular levels of 5-hydroxytryptamine in the rat. *Stress*, 4: 251-263, 1998.

Landrigan PJ, Sonawane B, Butler RN, Trasande L, Callan R, Droller D. Early environmental origins of neurodegenerative disease in later life. *Environ Health Perspect*, 113: 1230-1233, 2005.

Lapham LW, Cernichiari E, Cox C, Myers GJ, Baggs RB, Shamlaye CF, Davidson PW, Clarkson TW. An analysis of autopsy brain tissue from infants prenatally exposed to methylmercury. *Neurotoxicology*, 16: 689-704, 1995.

Leite FB, Prediger RD, Silva MV, de Sousa JB, Carneiro FP, Gasbarri A, Tomaz C, Queiroz AJ, Martins NT, Ferreira VM. Role of nicotine on cognitive and behavioral deficits in sepsis-surviving rats. *Brain Res*, 1507: 74-82, 2013.

Levy MM, Fink MP, Marshall JC, Abraham E, Angus D, Cook D, Cohen J, Opal SM, Vincent JL, Ramsay G. SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS. *Crit Care Med*, 31:1250-1256, 2003.

Lucena GM, Franco JL, Ribas CM, Azevedo MS, Meotti FC, Gadotti VM, Dafre AL, Santos ARS, Farina M. *Cipura paludosa* extract prevent methyl mercury-induced neurotoxicity in mice. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 101:127-131, 2007.

Lucena GM, Porto FA, Campos EG, Azevedo MS, Cechinel-Filho V, Prediger RD, Ferreira VM. *Cipura paludosa* attenuates long-term behavioral deficits in rats exposed to methylmercury during early development. *Ecotoxicol Environ Saf*, 73: 1150-1158, 2010.

Lucena GM, Prediger RD, Silva MV, Santos SN, Silva JF, Santos AR, Azevedo MS, Ferreira VM. Ethanolic extract from bulbs of *Cipura paludosa* reduced long-lasting learning and memory deficits induced by prenatal methylmercury exposure in rats. *Dev Cogn Neurosci*, 3: 1-10, 2013.

Luo J, Nguyen A, Villeda S, Zhang H, Ding Z, Lindsey D, Bieri G, Castellano JM, Beaupre GS, Wyss-Coray T. Long-term cognitive impairments and pathological alterations in a mouse model of repetitive mild traumatic brain injury. *Front Neurol*, 5: 12, 2014.

Maia CS, Lucena GM, Corrêa PBF, Serra RB, Matos RWM, Menezes FC, Santos SN, Sousa JB, Costa ET, Ferreira VM. Interference of ethanol and methylmercury in the developing central nervous system. *Neurotoxicology*, 30: 23-30, 2009.

Maia CD, Ferreira VM, Diniz JS, Carneiro FP, de Sousa JB, da Costa ET, Tomaz C. Inhibitory avoidance acquisition in adult rats exposed to a combination of ethanol and methylmercury during central nervous system development. *Behav Brain Res*, 211: 191-197, 2010.

Markowski VP, Flaugh CB, Baggs RB, Rawleigh RC, Cox C, Weiss B. Prenatal and lactational exposure to methylmercury affects select parameters of mouse cerebellar development. *Neurotoxicology*, 19: 879-892, 1998.

Martins EM, Pessano NT, Leal L, Roos DH, Folmer V, Puntel GO, Rocha JB, Aschner M, Ávila DS, Puntel RL. Protective effect of *Melissa officinalis* aqueous extract against Mn-induced oxidative stress in chronically exposed mice. *Brain Res Bull*, 87: 74–79, 2012.

Matcham F, Rayner L, Hutton J, Monk A, Steel C, Hotopf M. Self-help interventions for symptoms of depression, anxiety and psychological distress in patients with physical illnesses: A systematic review and meta-analysis. *Clin Psychol Rev*, 34: 141-157, 2014.

McBride WJ, Chernet E, McKinzie DL, Lumeng L, Li TK. Quantitative autoradiography of mu-opioid receptors in the CNS of alcohol-naive alcohol-preferring P and -nonpreferring NP rats. *Alcohol*, 16: 317-323, 1998.

McKee AC, Cantu RC, Nowinski CJ, Hedley-Whyte ET, Gavett BE, Budson AE, Santini VE, Lee HS, Kubilus CA, Stern RA. Chronic traumatic encephalopathy in athletes: progressive tauopathy after repetitive head injury. *J Neuropathol Exp Neurol*, 68: 709–735, 2009.

Mimica-Dukic N, Bozin B, Spkovic M, Simin N. Antimicrobial and antioxidant activities of *Melissa officinalis* L (Lamiaceae) essential oil. *J Agric Food Chem*, 52: 2485-2489, 2004.

Namas R, Zamora R, Namas R, An G, Doyle J, Dick TE, Jacono FJ, Androulakis IP, Nieman GF, Chang S, Billiar TR, Kellum JA, Angus DC, Vodovotz Y. Sepsis: something old, something new, and a systems view. *J Crit Care*, 27: 314 e1-11, 2012.

Newland R. A handle on learning. *Community Pract*, 81: 40-41, 2008.

Omalu BI, DeKosky ST, Minster RL, Kamboh MI, Hamilton RL, Wecht CH. Chronic traumatic encephalopathy in a National Football League player. *Neurosurgery*, 57:128–134, 2005.

Onishchenko N, Tamm C, Vahter M, Hökfelt T, Johnson JA, Johnson DA, Ceccatelli S. Developmental exposure to methylmercury alters learning and induces depression-like behavior in male mice. *Toxicol Sci*, 97: 428-37, 2007.

Otto GP, Sossdorf M, Claus RA, Rödel J, Menge K, Reinhart K, Bauer M, Riedemann NC. The late phase of sepsis is characterized by an increased microbiological burden and death rate. *Crit Care*, 15: 183, 2011.

Papadopoulos MC, Davies DC, Moss RF, Tighe D, Bennett ED. Pathophysiology of septic encephalopathy: a review. *Crit Care Med*, 28: 3019-3024, 2000.

Pellow S, Chopin P, File SE, Briley M. Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J Neurosci Methods*, 14: 149-167, 1985.

Perry N, Court G, Bidet N, Court J, Perry E. European Herbs with cholinergic activities: potential in dementia therapy. *Int Geriatr Psychiatry*, 11: 1063-1069, 1996.

Pinheiro da Silva F, Machado MC, Velasco IT. Neuropeptides in sepsis: From Brain pathology to systemic inflammation. *Peptides*, 44: 135-138, 2013.

Porsolt RD, Le Pichon M, Jalfre M. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature*, 5604: 730-732, 1977.

Pytel P, Alexander JJ. Pathogenesis of septic encephalopathy. *Curr Opin Neurol*, 22: 283-287, 2009.

Redrobe JP, Bourin M, Colombel MC, Baker GB. Psychopharmacological profile of the selective serotonin reuptake inhibitor, paroxetine: implication of noradrenergic and serotonergic mechanisms. *J Psychopharmacol*, 4: 348-355, 1998.

Rooney JP. The retention time of inorganic mercury in the brain – A systematic reviews of the evidence. *Toxicol Appl Pharmacol*, 274: 425-435, 2014.

Roza SJ, Hofstra MB, Van Der Ende J, Velhurst FC. Stable prediction of mood and anxiety disorders based on behavioral and emotional problems in childhood: a 14-year follow-up during childhood, adolescence, and young adulthood. *Am J Psychiatry*, 160: 2116–2121, 2003.

Schatzberg AF, Samson JA, Rothschild AJ, Bond TC, Regier DA. McLean Hospital depression research facility: Early-onset phobic disorders and adult-onset major depression. *Br J Psychiatry*, 173: 29–34, 1998.

Semmler A, Hermann, Momann F, Weberpals, Paxian SA, Okulla, Schäfers M, Kummer MP, Klockgether T, Heneka MT. Sepsis causes neuroinflammation and concomitant decrease of cerebral metabolism. *J Neuroinflamm*, 5: 38, 2008.

Silva E, Pedro M de A, Sogayar AC, Mohovic T, Silva CL, Janiszewski M, Cal RG, de Sousa EF, Abe TP, de Andrade J, de Matos JD, Rezende E, Assunção Avezum A, Rocha PC, de Matos GF, Bento AM, Corrêa AD, Vieira PC, Knobel E. Brazilian Sepsis Epidemiological Study. Brazilian Sepsis Epidemiological Study (BASES study). *Crit Care*, 8: R251-60, 2004.

Silver JM, McAllister TW, Arciniegas DB. Depression and cognitive complaints following mild traumatic brain injury. *Am J Psychiatry*, 166: 653–661, 2009.

Soulimani R, Fleurentin J, Mortier F, Misslin R, Derrieu G, Pelt JM. Neurotropic action of the hydroalcoholic extract of *Melissa officinalis* in the mouse. *Planta Med*, 57: 105-109, 1991.

Starkstein SE, Pahissa J. Apathy Following Traumatic Brain Injury. *J Psychiatr Clin North Am*, 37: 103-112, 2014.

Stern RA, Riley DO, Daneshvar DH, Nowinski CJ, Cantu RC, McKee AC. Long-term consequences of repetitive brain trauma: chronic traumatic encephalopathy. *PM R*, 3: 460–467, 2011.

Sumalan RM, Alexa E, Poiana MA. Assessment of inhibitory potential of essential oils on natural mycoflora and *Fusarium* mycotoxins production in wheat. *Chem Cent J*, 7: 32, 2013.

Taiwo AE, Leite FB, Lucena GM, Barros M, Silveira D, Silva MV, Ferreira VM. Anxiolytic and antidepressant-like effects of *Melissa officinalis* (lemon balm) extract in rats: Influence of administration and gender. *Indian J Pharmacol*, 44: 189-192, 2012.

Teles JM, Silva E, WeEsthal G, Filho RC, Machado FR. Surviving sepsis campaign in Brazil. *Shock*, 1: 47-52, 2008.

Treit D, Menard J, Royan C. Anxiogenic stimuli in the elevated plus-maze. *Pharm BiochemBehav*, 44: 463-469, 1993.

Treit D, Fundytus M. Thigmotaxis as a test for anxiolytic activity in rats. *Pharmacol Biochem Behav*, 31: 959–962, 1998.

Tuon L, Comim CM, Antunes MM, Constantino LS, Machado RA, Izquierdo I, Quevedo J, Dal-Pizzol F. Imipramine reverses the depressive symptoms in sepsis survivors rats. *Intensive Care Med*, 33: 2165-2167, 2007.

Vane JR, Botting RM. A better understanding of anti-inflammatory drugs based on isoforms of cyclooxygenase (COX-1 and COX-2). *Adv Prostaglandin Thromboxane Leukot Res*, 23: 41–48, 1995.

Vincent JL, Opal SM, Marshall JC, Tracey KJ. Sepsis definitions: time for change.

Lancet, 381: 774–775, 2013.

Viola H, Wolfman C, Levi SM, Wasowski C, Pena C, Medina JH, Paladini AC. Isolation of pharmacologically active benzodiazepine receptor ligands from *Tilia tomentosa* (Tiliaceae). *J Ethnopharmacol* 44: 47–53, 1994.

Wake G, Court J, Pickering A, Lewis R, Wilkins R, Perry E. CNS acetylcholine receptor activity in European medicinal plants traditionally used to improve failing memory. *J Ethnopharmacol*, 69: 105-114, 2000.

Wang D, Zhong X, Huang D, Chen R, Bai G, Li Q, Yu B, Fan Y, Sun X. Functional Polymorphisms of Interferon-gamma Affect Pneumonia-Induced Sepsis. *PLoS One*, 9: 1-20, 2014.

Ward NS, Casserly B, Ayala A. The compensatory anti-inflammatory response syndrome (CARS) in critically ill patients. *Clin Chest Med*. 4: 617-625, 2008.

Weiss B, Stern S, Cox C, Balys M. Perinatal and lifetime exposure to methylmercury in the mouse: behavioral effects. *Neurotoxicology*, 26: 675–690, 2005.

Williams WH, Potter S, Ryland H. Mild traumatic brain injury and postconcussion syndrome: a neuropsychological perspective. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 81: 1116–1122, 2010.

Wittchen HU, Beesdo K, Bittner A, Goodwin RD. Depressive episodes--evidence for a causal role of primary anxiety disorders? *Eur Psychiatry*, 18: 384-393, 2003.

World Health Organization. mhGAP intervention guide for mental, neurological and substance use disorders in non-specialized health settings: mental health Gap Action Programme (mhGAP). WHO, 2010

Young JF, Wosilait WD, Luecke RH. Analysis of methylmercury disposition in humans utilizing a PBPK model and animal pharmacokinetic data. *J Toxicol Environ Health A*, 63: 19-52, 2001.

Ziaja M. Septic Encephalopathy. *Curr Neurol Neurosci Rep*, 13: 383, 2013.

ANEXO



Universidade de Brasília

Instituto de Ciências Biológicas
Comitê de Ética no Uso Animal

Brasília, 01 de julho de 2009.

DECLARAÇÃO

Declaramos que o projeto intitulado "**AVALIAÇÕES COMPORTAMENTAIS E PATOLÓGICAS EM RATOS QUE SOBREVIVEM À SEPSE E AS IMPLICAÇÕES DECORRENTES DO USO DE SUBSTÂNCIAS QUÍMICAS.**", UnBDOC nº 33880/2009, sob responsabilidade da Profa. Vânia Maria Moraes Ferreira, foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso Animal (CEUA) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília.

Prof. Antonio Sebben
Coordenador do CEUA