



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

**EFEITOS COMPORTAMENTAIS E COGNITIVOS DA NICOTINA E DO
EXTRATO ETANÓLICO DE *MELISSA OFFICINALIS* NA SEPSE
EXPERIMENTAL**

FRANCO BATISTA LEITE

BRASÍLIA-DF
2012

FRANCO BATISTA LEITE

**EFEITOS COMPORTAMENTAIS E COGNITIVOS DA NICOTINA E DO
EXTRATO ETANÓLICO DE *MELISSA OFFICINALIS* NA SEPSE
EXPERIMENTAL**

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

Orientadora: **Profa. Dra. Vania Maria Moraes Ferreira.**

BRASÍLIA-DF
2012

FRANCO BATISTA LEITE

ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS DECORRENTES DA SEPSE
EXPERIMENTAL: NOVAS PERSPECTIVAS TERAPÊUTICAS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde,
da Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, como requisito à
obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Aprovada em 15 de Fevereiro de 2012

Profa Dra. Vania Maria Moraes Ferreira
Orientadora
Universidade de Brasília

Profa. Dra. Maria Clotilde Henriques Tavares
Membro Titular (interno)
Universidade de Brasília

Profa. Dra. Yanna Karla de Medeiros Nóbrega
Membro Titular (externo)
Universidade de Brasília

Prof. Dr. Luiz Antônio Soares Romeiro
Membro Suplente
Universidade de Brasília

Brasília-DF
2012

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ajudar em todas as etapas da minha vida

Aos meus pais, família e amigos, pelo incondicional apoio que sempre me deram.

A minha orientadora, Profa Vania Ferreira, pela ajuda, atenção, total dedicação e empenho para que eu pudesse concluir este trabalho.

Ao Centro Universitário UniCEUB, pelos animais experimentais.

Ao Laboratório de Patologia, da Faculdade de Medicina, pelo apoio constante na realização desta pesquisa.

!

" #

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Imunopatogênese e evolução da sepse	16
Figura 2 – Sepse x eixo hipotálamo-hipófise-supra renal.....	17
Figura 3 – Cirurgia de ligadura e perfuração cecal.....	24
Figura 4 – Campo aberto.....	25
Figura 5 – Labirinto em cruz elevado	26
Figura 6 – Esquiva inibitória do tipo step-down	27
Figura 7 – Nicotina: delineamento experimental.....	35
Figura 8 – Interferência da nicotina pré e/ou pós-sepse na atividade locomotora de ratos avaliados no Teste do Campo aberto.....	37
Figura 9 – Interferência da nicotina pré e/ou pós-sepse no comportamento de ansiedade de ratos avaliados no Teste do Labirinto em cruz elevado	38
Figura 10 – Interferência da nicotina pré e pós-sepse na memória de ratos avaliados no Teste da Esquiva inibitória	39
Figura 11 – Interferência da nicotina pós-sepse na memória de ratos avaliados no Teste da Esquiva inibitória	40
Figura 12 – Melissa officinalis.....	52
Figura 13 – Melissa: delineamento experimental	53
Figura 14 – Interferência do extrato de Melissa officinalis pós-sepse na atividade locomotora de ratos avaliados no Teste do Campo aberto	54
Figura 15 – Interferência do extrato de Melissa officinalis pós-sepse na ansiedade de ratos avaliados no Teste do Labirinto em cruz elevado	55
Figura 16 – Interferência do extrato de Melissa officinalis pós-sepse na memória de ratos avaliados no Teste da Esquiva inibitória	56

LISTA DE ABREVIATURAS

ACTH	Hormônio adenocorticotrófico
CEUA	Comitê de Ética no Uso Animal
CLP	Cirurgia de Ligadura e Perfuração
DZP	Diazepam
EBA	Entradas nos braços abertos
EBF	Entradas nos braços fechados
GABA	Ácido gama-aminobutírico
i.p	Via intraperitoneal
LCE	Labirinto em cruz elevado
LPS	Lipopolissacarídeos
MCD	Memória de curta duração
MLD.....	Memória de longa duração
OF	Operação fictícia
OMS	Organização Mundial da Saúde
SNC.....	Sistema Nervoso Central
TBA	Tempo nos braços abertos
TBF	Tempo nos braços fechados
TGO	Transaminase glutâmico oxalacética
TGP	Transaminase glutâmico pirúvica
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
v.o.	Via oral
s.c.....	Via subcutânea

RESUMO

A sepse é uma das principais causas de morte do mundo em unidades de terapia intensiva. Modelos experimentais de sepse em animais tem sido úteis para entender sua patogênese, em especial no que se refere à deterioração do estado mental. Dessa forma, é possível gerar dados pré-clínicos para o tratamento de algumas das consequências dessa infecção sistêmica. Com base nessas informações, o objetivo desta pesquisa foi investigar duas alternativas de tratamento para as respostas comportamentais decorrentes da sepse experimental: ativação colinérgica (nicotina) e medicina natural (*Melissa officinalis*). Para tal, foram usados ratos Wistar, divididos em dois grupos: Sepse experimental e Operação fictícia, que receberam dose diárias de nicotina (0,1 mg/kg, s.c.) ou extrato etanólico de *Melissa officinalis* (100 mg/kg, v.o.), uma semana antes e/ou uma semana pós-procedimentos cirúrgicos. Observou-se que a nicotina foi capaz de afetar a locomoção dos animais que sobreviveram à sepse no teste do campo aberto somente quando administrada pós-procedimentos cirúrgicos. Independente do tempo de tratamento, a nicotina aumentou a porcentagem de entradas e o tempo de permanência dos animais nos braços abertos do labirinto em cruz elevado (LCE), comportamento sugestivo de atividade ansiolítica. Quando a nicotina foi administrada durante duas semanas aumentou o tempo de latência dos animais no teste da esquiiva inibitória, sugestivo de melhora de memória. Em contrapartida, esses resultados não foram observados nos animais sobreviventes à sepse quando a nicotina foi administrada somente pós-procedimentos cirúrgicos. Na segunda etapa dos experimentos o extrato de *Melissa officinalis*, da mesma forma que a nicotina, aumentou a porcentagem de entradas e o tempo de permanência dos animais nos braços abertos do LCE, resposta similar ao diazepam, sem afetar a locomoção. No teste da esquiiva inibitória, o extrato melhorou a memória de curta e longa duração, fazendo com os animais permanecessem na plataforma por muito mais tempo quando comparados aos controles. De uma forma geral, a ativação colinérgica ou o uso de extrato de *Melissa officinalis* podem interferir de forma positiva na redução ou bloqueio das alterações comportamentais e cognitivas decorrentes da sepse experimental, ficando uma lacuna para a investigação dos mecanismos reguladores dessas respostas farmacológicas.

Palavras-chave : Ansiedade, Locomoção, Memória, *Melissa officinalis*, Nicotina, Sepse.

ABSTRACT

Sepsis is a major cause of death in the world in intensive care units. Experimental models of sepsis in animals have been useful in understanding its pathogenesis, particularly with regard to the deteriorating mental state. Thus, it is possible to generate preclinical data for the treatment of some of the consequences of systemic infection. Based on this information, the purpose of this study was to investigate two alternative treatments for the behavioral responses resulting from experimental sepsis: cholinergic activation (nicotine) and natural medicine (*Melissa officinalis*). To achieve this goal, Wistar rats were used divided into two groups: sham operation and experimental sepsis, who received daily doses of nicotine (0.1 mg / kg) or ethanolic extract of *Melissa officinalis* (100 mg/kg), one week before and/or one week post-surgical procedures. It was observed that nicotine was able to affect the locomotion of sepsis-surviving rats in the open field test only when administered post-surgical procedures. Regardless of treatment time, nicotine increased the percentage of entries and the time spent in the open arms of the EPM test, suggestive of anxiolytic activity. When nicotine was administered during two weeks increased the latency time of animals at the inhibitory avoidance test, suggestive of improvement of memory. However, these results were not observed in sepsis-surviving rats when nicotine was administered only post-surgical procedures. In the second step of the experiments the extract of *Melissa officinalis*, likewise the nicotine, increased the percentage of entries and time spent in the open arms of the EPM test, a response similar to diazepam without affecting locomotion. In the inhibitory avoidance test, the extract improved short and long-term memories, leading to the animals to remain on the platform much longer when compared to control groups. In general, the cholinergic activation or *Melissa officinalis* extract administration may interfere positively in reducing or blocking of behavioral and cognitive disorders resulting from experimental sepsis, leaving a gap for the investigation of regulatory mechanisms of these pharmacological responses.

Keywords : Anxiety, Locomotion, Memory, *Melissa officinalis*, Nicotine, Sepsis.

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO	13
1 INTRODUÇÃO	15
1.1 Sepse x choque séptico	15
1.2 Sepse x sistema de resposta ao estresse	17
1.3 Alternativas terapêuticas para tratamento da sepse	19
2 OBJETIVOS.....	22
3 MATERIAIS E MÉTODOS	23
3.1 Animais.....	23
3.2 Drogas e soluções.....	23
3.3 Cirurgia de Ligadura e Perfuração Cecal	23
3.4 Modelos experimentais.....	25
3.4.1 Teste do Campo aberto.....	25
3.4.2 Teste do Labirinto em cruz elevado	26
3.4.3 Teste da Esquiva inibitória do tipo step-down	27
3.5 Análise estatística	29
4. CAPÍTULO I – INFLUÊNCIA DA ATIVAÇÃO COLINÉRGICA (NICOTINA) NA SEPSE EXPERIMENTAL	30
4.1 INTRODUÇÃO	31
4.1.1 Nicotina: aspectos gerais	31
4.1.2 Sepse x consumo de nicotina.....	33
4.2 MATERIAIS E MÉTODOS	35
4.2.1 Regime de tratamento da nicotina.....	35
4.3 RESULTADOS.....	37
4.3.1 Teste do Campo aberto.....	37
4.3.2 Teste do Labirinto em cruz elevado	37
4.3.3 Teste da Esquiva inibitória do tipo step-down	39
4.4 DISCUSSÃO	41
4.5 CONCLUSÕES.....	46

5. CAPÍTULO II – EFEITOS NEUROPROTETORES DO EXTRATO DE MELISSA OFICINALIS NA SEPSE EXPERIMENTAL	47
5.1 INTRODUÇÃO	48
5.1.1 Plantas medicinais: aspectos gerais	48
5.1.2 Melissa officinalis	50
5.2 MATERIAIS E MÉTODOS	52
5.2.1 Preparo e regime de tratamento do extrato de Melissa officinalis	52
5.3 RESULTADOS.....	54
5.3.1 Teste do Campo aberto.....	54
5.3.2 Teste do Labirinto em cruz elevado	55
5.3.3 Teste da Esquiva inibitória do tipo step-down	56
5.4 DISCUSSÃO	57
5.5 CONCLUSÕES	60
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	61
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63
ANEXO	77
Comprovante do Comitê de Ética no Uso Animal (CEUA)	77

APRESENTAÇÃO

Na minha área de atuação como Farmacêutico-Bioquímico, atuando em laboratórios de análises clínicas pertencentes aos hospitais públicos e privados, sempre me deparei com solicitações de exames laboratoriais cuja indicação clínica primordial era a “Sepse”, principalmente nos pedidos provenientes dos pacientes de Unidades Terapia Intensiva (UTIs) e UTIs neonatal. Observei que muitos destes pacientes tinham seus estados clínicos agravados com o passar do tempo e muitos eram levados ao óbito.

Verifiquei, através de leituras de artigos e publicações em jornais e revistas, que as estatísticas de mortalidade provocada pela sepse grave no Brasil apresentam números um tanto quanto alarmantes, situação que é derivada de diversos fatores destacando-se, entre eles, a atual situação da saúde pública e privada em nosso País, a falta de uma estrutura adequada e de UTIs para o atendimento ideal requerido para este tipo de doença. Outro fator que corroborou para o que foi descrito acima é o fato de o complexo mecanismo da sepse ainda não estar totalmente elucidado, necessitando de mais pesquisas que busquem maiores esclarecimentos para desvendar a sua fisiopatologia e o desenvolvimento de novos tipos de tratamento.

Este fato despertou em mim o interesse em saber mais sobre esse quadro clínico que tanto acomete pacientes internados nos hospitais, saber sobre suas complicações e as principais sequelas que podem apresentar os pacientes sobreviventes a esta doença. Durante esta busca me deparei com o grupo de pesquisa da professora Vania Ferreira, da Faculdade Ciências de Saúde, da Universidade de Brasília (UnB), que vinha trabalhando nesta área, nos últimos anos.

Surgiu, então, a oportunidade de participar deste grupo e desenvolver esta dissertação de mestrado que buscou verificar os possíveis danos cognitivos de memória e os prejuízos causados no quadro de ansiedade pela sepse e também verificar o efeito da ativação colinérgica (nicotina) e do uso de *Melissa officinalis* na melhora destes quadros, por meio de modelos experimentais com ratos Wistar.

Nesse sentido, a dissertação foi organizada em nove partes que se inicia por esta Apresentação, na qual se destaca a motivação para o estudo, a justificativa e a relevância da pesquisa. Na Introdução ocorre o nucleamento da temática com uma revisão da literatura simplificada dos assuntos, que são mais bem explorados nos capítulos específicos. A seguir, são pontuados os Objetivos .

Na sequência, os Materiais e Métodos utilizados na investigação experimental, pontuando os sujeitos experimentais, tipos de drogas e soluções usados, as etapas para a realização das cirurgias de indução de sepse, os modelos experimentais escolhidos com os fundamentos e procedimentos experimentais dos testes utilizados com os ratos: Campo aberto (locomotoão), Labirinto em cruz elevado (ansiedade) , Esquiva inibitória (memória) e, por fim, as análises estatísticas.

Para melhor compreensão dos estudos realizados, esta dissertação está dividida em dois capítulos : 1) Influência da ativação colinérgica (nicotina) nas alterações comportamentais e cognitivas decorrentes da sepse experimental e 2) Efeitos neuroprotetores do extrato de *Melissa officinalis* na sepse experimental. Ambos estão constituídos por uma Introdução, Metodologia, Resultados, Discussão e Conclusões - tópicos específicos para cada abordagem.

Finaliza-se a dissertação com as Considerações finais , onde se discorre sobre os principais achados, seguidas das Referências Bibliográficas. O comprovante do Comitê de Ética autorizando a pesquisa encontra-se como Anexo .

1 INTRODUÇÃO

1.1 Sepses x Choque séptico

A sepsis está entre as principais causas de morte de pacientes em Unidades de Terapia Intensiva - UTI (Angus et al., 2001). O assunto merece reflexão em virtude de sua gravidade e do impacto econômico e social que é gerado no mundo. O Brasil se destaca no contexto mundial com uma das mais elevadas taxas de mortalidade por choque séptico, com pacientes mais graves e com maior tempo de internação (Sales Júnior et al., 2006).

Geralmente, cerca de 2% a 11% das internações hospitalares são em decorrência desse quadro, onde a mortalidade varia entre 20% a 80% (Angus et al., 2001; Friedman et al., 1998). Angus et al. (2001) analisaram mais de 6 milhões de registros de alta hospitalar de sete estados nos Estados Unidos e estimaram que 751.000 casos severos de sepsis ocorrem anualmente naquele país, com uma taxa de mortalidade de 28,6%, levando a um custo médio de \$22.100 por caso.

A sepsis é atualmente definida como a combinação de infecção patológica e mudanças fisiológicas, conhecida coletivamente como uma síndrome de resposta inflamatória sistêmica. Esse quadro, por sua vez, caracteriza-se por febre ou hipotermia, leucocitose ou leucopenia e taquicardia ou taquipnéia. Os mediadores inflamatórios liberados durante a sepsis favorecem o comprometimento endotelial, provocam vasodilatação periférica, hipovolemia, danos teciduais, ativação do sistema complemento e a evolução do quadro séptico como hipotensão e disfunção aguda de órgãos, que podem culminar com a morte dos pacientes (Hanna, 2003; Kimura et al., 2010).

As interações complexas dos mediadores inflamatórios podem ser sinérgicas ou antagônicas, aumentando a resposta do hospedeiro à infecção por estimular a produção de muitos mediadores químicos periféricos ou no Sistema Nervoso Central (SNC) levando a várias consequências, sejam fisiológicas ou comportamentais (Cai et al., 2010; Ivády et al., 2011; Kimura et al., 2010; Russell et al., 2011).

Uma das complicações mais comuns que pode ser observada é a disfunção

múltipla de órgãos que se caracteriza pela deterioração aguda da função de dois ou mais órgãos (Figura 1), sendo os mais comumente afetados os pulmões, rins, coração, fígado e o SNC – que neste caso pode levar a uma encefalopatia séptica (Karima et al., 1999; Szatmári et al., 2010).

A encefalopatia séptica é definida por uma disfunção cerebral relacionada à presença de microorganismos ou suas toxinas na circulação sanguínea. Esse quadro tem ocorrido em muitos pacientes sépticos em graus variados. Ela se caracteriza pela deterioração do estado mental ou do nível de consciência devido à infecção sistêmica (Wilson e Roos, 2011). Os sinais clínicos das anormalidades neurológicas incluem alto grau de estresse, agitação, confusão, desorientação, letargia e coma (Cai et al., 2010; Kimura et al., 2010; Szatmári et al., 2010).

1.2 Sepsis x Sistema de resposta ao estresse

A sepsis resulta em distúrbios na regulação normal dos sistemas neuroendócrino, metabólico e imunológico, podendo refletir em vários aspectos comportamentais. O sistema cerebral de resposta ao estresse nessa condição é ativado em situações de perigo ou trauma. O sistema imunológico responde automaticamente aos patógenos e moléculas desconhecidas. Os dois sistemas são os principais recursos do corpo para manter o equilíbrio dinâmico do meio interno, denominado homeostase. Quando esta é perturbada ou ameaçada, um repertório de respostas celulares, moleculares e comportamentais é acionado para neutralizar as forças perturbadoras e estabelecer o equilíbrio dinâmico (Russell et al., 2011; Van der Poll et al., 2011).

No que se refere à alteração neuroendócrina do estresse provocada pela sepsis chama-se atenção para a insuficiência adrenal, condição em que a liberação de citocinas por macrófagos, induzida por agentes invasores (bactérias), atua na ativação do eixo hipotálamo hipófise-adrenal, aumentando a liberação de ACTH e estimulando a produção de cortisol. Esse evento ocasiona, na maioria das vezes, uma imunossupressão (Figura 2) (Bauer, 2002; Michelson et al., 1994).

! " # " " ! " \$ % & ' (+, -
) " \$
 . /00/1

A migração, a distribuição e a localização dos leucócitos no organismo são de extrema importância para o desenvolvimento das respostas imunológicas (Michelson et al., 1994). Estudos demonstraram que durante a presença de certa concentração de glicocorticóides no sangue (ou no estresse crônico), os linfócitos migram para a medula óssea, talvez como uma proteção contra os efeitos nocivos dos níveis elevados de glicocorticóides circulantes (Bauer, 2002). A supressão dos efeitos antiinflamatórios do cortisol, como resultado de estresse excessivo, leva ao hipermetabolismo que é visto na sepse como choque séptico (Das, 2011).

Após a sepse pode ocorrer, em primeira instância, um aumento expressivo do número sanguíneo de neutrófilos (leucócitos envolvidos na resposta inflamatória) e, em um segundo momento, uma redução considerável na contagem de linfócitos (leucócitos envolvidos na fase reguladora e disparadora da resposta imune). É importante salientar que as mudanças no número dessas células na circulação promovem uma migração temporária de leucócitos do sangue para os tecidos ou vice-versa. Essa migração é coordenada através da ligação dessas substâncias às moléculas de adesão celular, presentes na superfície dos leucócitos e dos vasos sanguíneos (Michelson et al., 1994; Russell et al., 2011).

Levam-se também em consideração o controle metabólico, a utilização da ventilação mecânica e a terapia nutricional que devem ser igualmente bem administrados e controlados em pacientes críticos. As cascatas inflamatórias e de coagulação, por sua vez, não tem resposta fechada de todas as vias. A proteína C ativada recombinante humana mostrou redução na mortalidade e seus resultados foram bastante relevantes e confirmaram a importância da interferência nos mecanismos inflamatórios e da coagulação (Sales Júnior et al., 2006).

Estudos sobre a sepse em humanos, portanto, são de grande relevância para a comunidade científica, contudo, são de difícil acesso devido à gravidade da doença que requer intervenção médica imediata e devido à heterogeneidade dos pacientes, que limitam o estudo clínico. Atualmente, as terapias experimentais usadas para combater a sepse tem sido alvos de pesquisas a fim de entender a sua fisiopatologia, bem como melhorar a sobrevivência dos pacientes. Elas tem representado um avanço na terapia de suporte do paciente e no desenvolvimento de novas drogas (Wiersinga, 2011).

1.3 Alternativas terapêuticas para tratamento da sepse

A antibioticoterapia é indispensável para o tratamento do paciente séptico (Kumar et al., 2006). Muitos antibióticos de amplo espectro são utilizados com o propósito de evitar consequências tardias da sepse. Para se obter efetividade é necessário se ter níveis séricos adequados da droga, evitando concentrações tóxicas do medicamento. Para a escolha da dose do antimicrobiano deve-se levar em conta as diferentes classes e características farmacocinéticas dos antibióticos (McKenzie, 2011; Scaglione et al., 2010; Textoris et al., 2011).

A natureza também auxilia oferecendo antimicrobianos eficazes para tratar uma grande variedade de infecções causadas por bactérias, vírus e fungos, ao mesmo tempo que essas substâncias oferecem suporte terapêutico para múltiplos órgãos e sistemas do corpo (McKenzie, 2011; Scaglione et al., 2010; Textoris et al., 2011). Embora exista uma grande variedade de medicamentos para tratar a maioria das formas de infecções microbianas, é importante ter em mente a frequência e gravidade dos efeitos adversos que, muitas vezes, acompanham estes tipos de tratamentos. No entanto, como o arsenal de antibióticos disponíveis no mercado vem sendo progressivamente esgotado devido à resistência microbiana, há cada vez mais necessidade de tratamentos alternativos (Schmieder e Edwards, 2012).

Uma escolha errada dos antibióticos a serem administrados pode aumentar a taxa de mortalidade dos pacientes sépticos. Por isso, as terapias de largo espectro estão sendo utilizadas por muitos especialistas com o objetivo de evitar tratamentos tardios e uso inadequado de antibióticos. Portanto, a abordagem precoce do agente infeccioso, seja pelo controle do foco infeccioso ou pela antibioticoterapia adequada, é fundamental para a boa evolução do paciente (McKenzie, 2011; Schmieder e Edwards, 2012).

As infecções intra-abdominais resultantes da sepse são frequentemente polimicrobianas causadas, na maioria das vezes, por bacilos gram-negativos e anaeróbios, sendo uma das exceções as infecções por enterococos que surgem após antibioticoterapia prévia. Na peritonite bacteriana espontânea, os agentes mais comuns são *Escherichia coli* e *Streptococcus pneumoniae*. As peritonites

secundárias são causadas, geralmente, por perfuração de vísceras ocas e tem etiologia polimicrobiana. Infecções das vias biliares também são polimicrobianas e incluem bacilos gram-negativos, anaeróbios e enterococos (Camargo e Rigato, 2004).

As terapêuticas propostas baseiam-se em fatores de risco, resultados de estudos e sugestões de sociedades de especialistas (Nível de evidência V - Grau de recomendação E) (Bohnen et al., 1992; Mazuski, 2002):

Terapia Presuntiva para Peritonite Bacteriana Espon tânea	
Primeira opção :	Ceftriaxona 2 g/dia ou Cefotaxima 3 g/dia
Segunda opção	Ampicilina-sulbactam 3 g cada 6 h OU Ticarcilina-clavulanato 3,1 g cada 4-6 h OU Piperacilina-tazobactam 4,5 g cada 6 h OU Imipenem 500 mg cada 6 h OU Clindamicina 600 mg cada 6 h + Ciprofloxacina 400 mg, por via venosa cada 12 h (indicado para alérgicos à penicilina)
Terapia Presuntiva para Peritonite Bacteriana Secun dária	
Primeira escolha	Piperacilina-tazobactam 4,5 g cada 6 h + metronidazol 500 mg, por via venosa cada 8 h ou Imipenem 500 mg cada 6 h ou Meropenem 1 g cada 6 h ou Ciprofloxacina 400 mg, por via venosa cada 12 horas + metronidazol 500 mg, por via venosa cada 8 horas ou Cefalosporina de 3ª ou 4ª geração + metronidazol 500 mg, por via venosa cada 8 horas.
Segunda escolha	Uso da clindamicina como anaerobicida; Uso de aminoglicosídeos, devido à toxicidade e à má distribuição em cavidades

, - 2 /003

O tempo ideal de administração dos antibióticos é estabelecido pela necessidade de adequar o tempo para se obter efetividade e evitar o uso excessivo e seus efeitos adversos (Salomão et al., 2011). Ao identificar o patógeno a escolha da antibioticoterapia se torna mais efetiva. Entretanto, as opções combinadas e isoladas são frequentemente questionadas em pacientes sépticos. Antimicrobianos associados aumentam a probabilidade de o microrganismo ser suscetível após resultado de culturas, quando comparado à monoterapia (Camargo e Rigato, 2004).

Com isso, alguns critérios devem ser utilizados, tais como: doença de base, susceptibilidade dos patógenos (ex: hospital ou comunidade), história clínica incluindo intolerância aos medicamentos e infecções prévias (Apisarnthanarak et al., 2008; Eachempati et al., 2009). Desta forma, encontrar estudos que assegurem essas intervenções nesses aspectos torna-se essencial para eleger a melhor estratégia (Salomão et al., 2011).

O limite de segurança mínimo que se deve ter para investigar os mecanismos de ação *in vivo* de compostos novos ou pouco conhecidos em humanos restringe-se ao número e tipos de estudos que podem ser realizados. Embora alguns distúrbios sejam exclusivos de humanos, muitos modelos animais tem sido desenvolvidos com o objetivo de elucidar os substratos neurais que subsidiam diferentes respostas comportamentais, incluindo as de natureza emotiva (Fisch, 2007; Van der Staay et al., 2009).

Neste contexto, o uso de modelos animais torna-se fundamental, visto que vários deles podem mimetizar diversas psicopatologias e estão disponíveis para estudar as funções normais e patológicas do SNC, sendo úteis para entender a patogênese da sepse e gerar dados pré-clínicos para o seu tratamento (Bauzo e Bruijnzeel, 2012; Cassol-Jr et al., 2010; Comim et al., 2011).

O uso desses modelos também permite abrir um leque de alternativas para a realização de pesquisas celulares e moleculares, envolvendo neurotransmissores e receptores que se constituem em ferramentas fundamentais para um melhor esclarecimento de mecanismos fisiológicos, farmacológicos, bioquímicos, comportamentais e neurobiológicos envolvidos na sepse. Diante disso, cabe explorar alguns desses modelos experimentais animais para se estudar principalmente a ansiedade e alterações de memória, que são dois quadros clínicos normalmente observados em sobreviventes à sepse.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar possíveis alternativas de tratamento para as alterações comportamentais e cognitivas decorrentes da sepse, em ratos.

2.2 Específicos

Observar as possíveis alterações comportamentais e cognitivas decorrentes da sepse experimental em ratos.

Verificar o efeito da estimulação da ativação colinérgica, por meio da administração da nicotina pré e/ou pós-sepse experimental, na atividade locomotora, ansiedade e memória de ratos.

Analisar os efeitos do extrato de *Melissa officinalis* na locomoção, ansiedade e memória de ratos sobreviventes à sepse experimental.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Para a realização dos testes experimentais foram utilizados ratos Wistar machos (n=116), com 2,5 meses, com uma média de 300 gr, provenientes do Biotério do Centro Universitário UniCEUB e mantidos durante o período de uma semana para habituação no Laboratório de Patologia, da Faculdade de Medicina, da Universidade de Brasília (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. As cirurgias e os testes foram realizados no mesmo Laboratório, no período de janeiro à dezembro de 2011.

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 Biologia, da Universidade de Brasília, conforme comprovantes anexados na página 77.

3.2 Drogas e soluções

As substâncias utilizadas na pesquisa e seus regimes de tratamento serão descritos detalhadamente no capítulo 1 (nicotina) e capítulo 2 (extrato etanólico de *Melissa officinalis*). As vias de administração e doses consideradas nos estudos estão de acordo com pesquisas prévias realizadas por nosso grupo de trabalho ou informações literárias provenientes de artigos científicos indexados internacionalmente.

3.3 Cirurgia de Ligadura e Perfuração (CLP) Cecal

Após serem anestesiados com ketamina (80 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg) intraperitoneal (i.p.), os animais passaram pelos procedimentos demonstrados na Figura 3. Foi feita uma incisão central no ventre do animal de aproximadamente 2

cm, seguida da exposição do ceco e obstrução (ligadura parcial) no segmento distal próximo da válvula íleo-cecal. O ceco foi perfurado com agulha 14G na borda antimesentérica. Após a verificação da saída de fezes do ceco, o mesmo foi retornado à cavidade abdominal. A incisão cirúrgica foi fechada em 2 planos de sutura fácia e músculos abdominais com poliéster 4 (0) em pontos contínuos. Por último foi administrada 50 ml/Kg 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. Finalizados os procedimentos, todos os animais receberam por via intraperitoneal (i.p.) doses dos antibióticos ceftriaxona (30 mg/kg) e clindamicina (25 mg/kg) durante três dias consecutivos, conforme descritas na literatura e padronizadas por outros grupos de pesquisadores que trabalham com a mesma técnica experimental (Comim et al., 2011; Barichello et al., 2011).

Os testes ocorreram uma semana pós-cirurgias, 1h após a administração do extrato de Melissa (via oral – v.o.) ou 30 min após a administração da nicotina (s.c.). As soluções controles foram administradas pelas mesmas vias obedecendo ao tempo de tratamento das substâncias em estudo, que serão descritas com detalhes nos capítulos específicos.

9,69 : + 451 %6 7 (6 7 ! 86 6 .6 %

3.4 Modelos experimentais

3.4.1 Teste do Campo Aberto

Aparato: Arena em madeira (60x60x35 cm), com o chão dividido em nove quadrantes de 20x20 cm (Figura 4).

; ! 9 <

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 aclimatação 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 8:00 e 12:00 h, com o objetivo de evitar a influência de variações circadianas, que poderiam interferir com os resultados experimentais.

3.4.2 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 5).

4 9 ((: " ! *

" 4 <

Fundamento: O LCE é baseado, entre outros fatores, na aversão natural que roedores apresentam pelos braços abertos do labirinto (Cruz et al., 1994; Montgomery, 1955), pois quando são forçados a permanecerem nos braços abertos desse aparato mostram manifestações fisiológicas e comportamentais de medo, tais como congelamento, defecação, e aumento nos níveis de corticosteróides plasmáticos (Pellow et al., 1985). Como consequência, eles permanecem um tempo maior nos braços fechados.

Estudos de 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 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. 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. As 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).

3.4.3 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 9 cm entre si, que constitui o assoalho da caixa, conectadas a um estimulador elétrico (Figura 6).

) 4 ! 8 = , +, >
4 ?89 =,> 1

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 (Maia et al., 2009; Castro et al., 2012). Para tal, os parâmetros de avaliação envolvem uma fase de treino e pós-treino e um choque de baixa intensidade, que servirá de estímulo aversivo para que o animal deixe de executar uma determinada tarefa que foi a ele apresentada. Esse procedimento deverá 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. Assim que o animal desceu da plataforma 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 no modelo de esQUIVA inibitória do tipo step-down 1,5 h após o treino. No teste, o tempo (latência) máximo de 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 no mesmo aparato 24h após o treino. Da mesma forma que na MCD, o tempo (latência) máximo de 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 sempre eram limpos com álcool 10% (v/v) para evitar que o odor do animal recém-testado interferisse no comportamento do animal seguinte a ser testado.

3.5 Análise estatística

Os dados foram expressos como a média \pm erro padrão da média (e.p.m.) de 8-10 animais por grupo. As comparações estatísticas dos resultados foram realizadas pela Análise de Variância (ANOVA) de uma via e os grupos foram comparados entre si pelo teste post-hoc de Newman-Keuls. A probabilidade indicativa da existência de diferença estatisticamente significativa foi de $p < 0,05$. Os dados foram analisados utilizando-se o software GraphPad Prism, versão 5.01®, 2010 (San Diego, CA).

Para a avaliação dos dados do tempo de latência no teste de esQUIVA inibitória do tipo step-down foi realizada uma análise não-paramétrica onde foram utilizadas as medianas (com seus intervalos interquartis) e analisadas através do Kruskal-Walis seguido do teste post hoc de Dunn.

--- 4. CAPITULO I ---

Influência da ativação colinérgica (nicotina) nas a Iterações
comportamentais e cognitivas decorrentes da sepse e xperimental

4.1 INTRODUÇÃO

4.1.1 Nicotina: aspectos gerais

A nicotina é uma droga psicoativa estimulante do SNC podendo levar à dependência física e psicológica (Goodwin et al., 2012). O seu uso pode ser dependente do ambiente ou predisposição genética, interferindo em várias alterações emocionais, aprendizagem e memória (Mehta et al., 2012). Entretanto, uma realidade negativa pode se fazer presente, observada com o tempo de uso prolongado ou em decorrência de altas doses ou concentrações da mesma (Ebbert e Fagerstrom, 2012; Hays et al., 2012; Hurley et al., 2012).

A American Psychiatry Association reconhece que os transtornos de humor, de ansiedade e outros relacionados à nicotina podem ser mais comuns em indivíduos que fumam do que nos ex-fumantes ou naqueles que jamais fumaram (APA, 2002). Dentre tantas complicações, observa-se que esta droga pode afetar gravemente a função de vários órgãos, levando inclusive à fatalidade (Hurley et al., 2012). A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que mais de um bilhão de pessoas sejam fumantes e há uma estimativa de que até 2030 o total de mortalidade, decorrente do consumo de tabaco, vai chegar a dez milhões por ano (OMS, 2001).

As partículas presentes no fumo carregam a nicotina para os pulmões, onde elas são rapidamente absorvidas na circulação pulmonar e movem-se rapidamente para o cérebro, onde elas se ligam aos receptores colinérgicos nicotínicos – que são canais iônicos que, normalmente, se ligam à acetilcolina, permitindo a entrada de sódio e cálcio. A estimulação dos referidos receptores libera uma variedade de neurotransmissores no cérebro (Benowitz, 2010).

A dopamina é um dos neurotransmissores que merece atenção, visto que sinaliza a experiência prazerosa e é crítica para os efeitos reforçadores da nicotina e outras drogas de abuso (De Biasi e Dani, 2011). Tal afirmação deve-se ao fato de que lesões induzidas experimentalmente em neurônios que liberam dopamina evitaram que ratos se auto-administrassem nicotina. Os neurônios dopaminérgicos

na área tegmental ventral e núcleo accumbens são críticos para a recompensa induzida por drogas, visto que ambas as áreas tem um papel nas percepções de prazer e recompensa (Dani e De Biasi, 2001; Nestler, 2005).

Além da dopamina, a nicotina aumenta também a liberação de glutamato (a qual facilita a liberação de dopamina) e ácido gama-aminobutírico – GABA (a qual inibe a liberação de dopamina). Com a exposição de longa duração à nicotina, alguns receptores colinérgicos nicotínicos tornam-se dessensibilizados, enquanto outros não se alteram. Como resultado, a resposta inibitória mediada pelo GABA é diminuída, enquanto a excitação mediada pelo glutamato é persistida, aumentando a excitabilidade dos neurônios dopaminérgicos e melhorando a responsividade à nicotina (Benowitz, 2010).

A base farmacológica da dependência à nicotina, portanto, envolve uma combinação de reforçamentos negativos e positivos. Diante disso, os fumantes usam essa substância com o propósito de induzir prazer, além de reduzir o estresse e ansiedade, melhorar a concentração e o desempenho nas tarefas realizadas. No entanto, quando o uso da nicotina é suspenso, os sintomas da abstinência se fazem presentes, como por exemplo, irritabilidade, humor deprimido, inquietação e ansiedade (Bauzo e Brujinzeel, 2012; De Biasi e Dani, 2011). A intensidade e a variabilidade dessas alterações são similares aquelas encontradas em pacientes psiquiátricos. A anedonia, que é o sentimento de pouco prazer pela vida, pode também ocorrer diante da abstinência à nicotina (Benowitz, 2010).

Além do lado comportamental e cognitivo, o fumo também está positivamente correlacionado com a inflamação. Os metais e os componentes glicoproteicos do tabaco que fazem parte do cigarro são pró-inflamatórios. Com isso, indivíduos que fumam tem uma resposta imunológica humoral diminuída. Em contrapartida, eles apresentam uma resposta aumentada das células imunológicas inatas (Taylor et al., 2011). Embora existam muitos estudos controversos relacionados aos efeitos da ativação colinérgica nicotínica, estudos recentes tem mostrado como as mudanças e funções desses receptores podem ser significantes para as alterações neuroquímicas, patológicas e clínicas podem estar envolvidas com os processos cognitivos e as alterações emocionais citadas anteriormente (Ebbert e Fagerstrom, 2012; Hays et al., 2012; Mehta et al., 2012).

4.1.2 Sepses x consumo de nicotina

Conforme comentado previamente, entre os sinais clínicos de anormalidades neurológicas após a sepse observa-se o alto grau de mudanças comportamentais tais como estresse, agitação, confusão e desorientação, o qual pode levar à letargia e coma (Cai et al., 2010; Szatmari et al., 2010). Além disso, os sobreviventes de sepse das UTIs apresentaram prejuízos cognitivos de longa duração, incluindo alterações na memória e ansiedade, os quais foram associados à diminuição na qualidade de vida (Hopkins e Brett, 2005; Rothenhausler et al., 2001).

Sabendo-se de muitas limitações das pesquisas envolvendo seres humanos, muitos modelos experimentais de CLP em ratos foram padronizados e, hoje, são clinicamente relevantes visto que eles induzem uma sepse polimicrobiana que mimetiza a sepse humana (Barichello et al., 2007, Silva et al., 2011). Estudos prévios tem demonstrado que ratos submetidos ao modelo de CLP exibiram prejuízos de memória e aprendizagem, bem como as mudanças emocionais que persistiram por, pelo menos, 30 dias após a indução da sepse (Barichello et al., 2005, 2007; Comim et al., 2011). Portanto, a CLP parece representar um bom modelo para a investigação das alterações cognitivas e emocionais de longa duração induzidas pela sepse.

Associado ao problema da sepse chama-se a atenção para o fato de que muitas variáveis podem se fazer presente e que, na maioria das vezes, foge ao conhecimento da classe médica – que é o fato do paciente ser usuário de drogas. As infecções são reconhecidas mundialmente como uma das mais sérias complicações decorrentes do consumo de drogas (Bhatty et al., 2011; Rahmanian et al., 2011).

No caso da nicotina, pelo fato de ser uma droga lícita, muitas vezes esse consumo é de conhecimento da classe médica, mas não é dado o devido valor da sua interferência no quadro apresentado por um paciente com sepse. A literatura científica reforça a necessidade de explorar essa problemática, em especial porque a administração de nicotina e as suas respostas decorrentes da síndrome de abstinência afetam os sobreviventes decorrentes de um quadro séptico (Steiner et al., 2008), o que deveria modificar o direcionamento de um tratamento mais eficaz.

Pesquisando a ativação dos receptores nicotínicos da acetilcolina, observou-se que possivelmente os macrófagos, seja pela estimulação elétrica dos nervos eferentes do vago (o qual libera acetilcolina) ou pela administração da nicotina, tem mostrado suprimir a produção de várias citocinas pró-inflamatórias e atenuar vários sintomas (i.e., letargia, diarreia, piloereção, febre e mal-estar) em roedores submetidos à sepse experimental (Matsunaga et al., 2001; Wang et al., 2004). Por outro lado, o nervo vago tem mostrado promover respostas exageradas às doses de lipopolissacarídeos (LPS, um constituinte da parede celular das bactérias gram-negativas) que induz choque (Borovikova et al., 2000; Ivanov et al., 2000).

Estudos prévios também demonstraram que a administração da nicotina ou agonistas dos receptores α -7 nicotínicos da acetilcolina diminuiu a mortalidade em camundongos com sepse causada pela CLP (Pavlov et al., 2007; Tsoyi et al., 2011; Wang et al., 2004). Ao contrário, outros estudos mostraram que a administração aguda de nicotina aumentou a mortalidade em camundongos submetidos ao CLP (Steiner et al., 2008) bem como em modelo de sepse induzido por *Escherichia coli* em camundongos (van Westerloo et al., 2005).

Chama-se a atenção para o fato de que humanos e animais laboratoriais que receberam nicotina cronicamente tornaram-se tolerantes, fenômeno resultado provavelmente da dessensibilização dos receptores nicotínicos da acetilcolina (Marks et al., 1985; Robinson et al., 2007). Esses achados parecem ser importantes para delinear possíveis explicações moleculares relacionadas à sepse e suas mudanças comportamentais associadas à administração crônica desta substância.

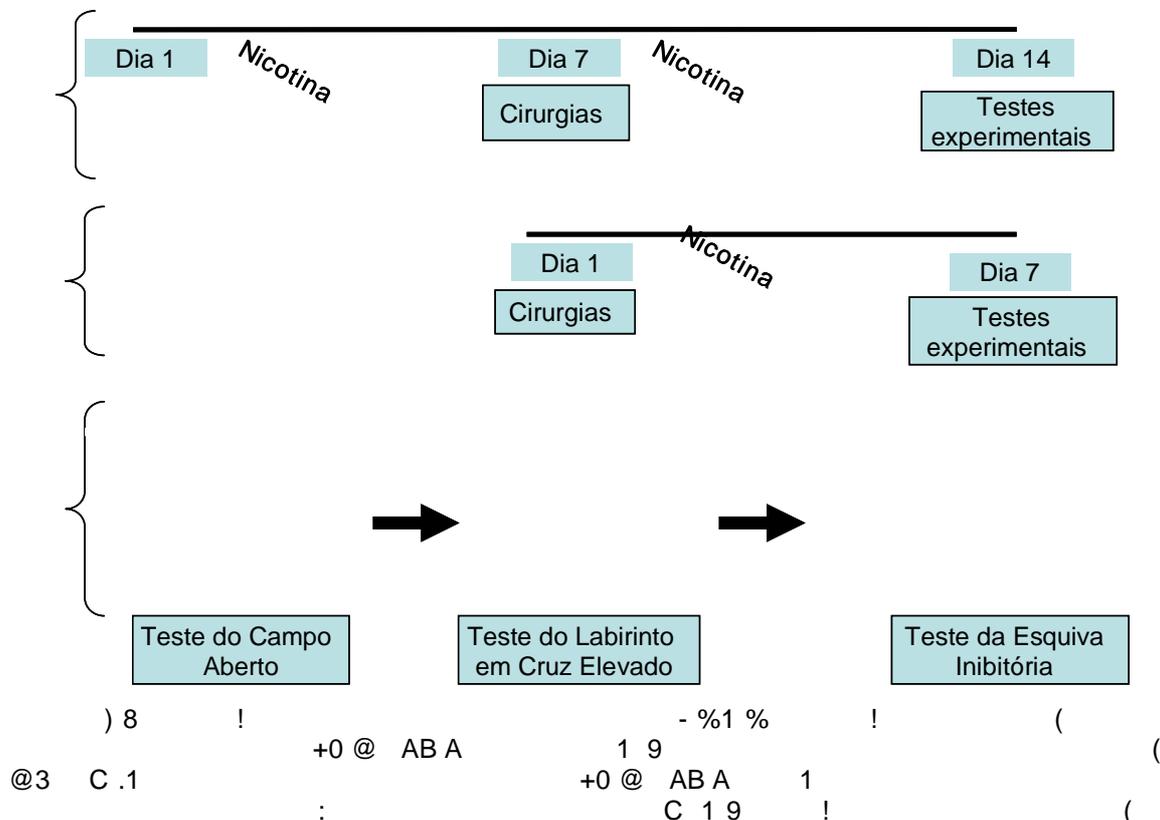
Portanto, o objetivo deste estudo foi investigar se a ativação colinérgica, por meio da administração repetida de nicotina (antes e/ou após CLP), pode melhorar os déficits comportamentais e de memória em ratos sobreviventes à sepse.

4.2 MATERIAIS E MÉTODOS

Animais, Cirurgias e Modelos experimentais - conforme descrito anteriormente nas páginas 23-29.

4.2.1 Regime de tratamento da nicotina

A nicotina (0,1 mg/kg) foi administrada diariamente por via s.c., durante uma ou duas semanas. No regime de duas semanas, a CLP foi realizada uma semana posterior o início da administração da droga, sendo que a nicotina continuou por mais uma semana, totalizando 14 dias de tratamento (Figura 7A). No regime de uma semana de administração da droga, a CLP foi realizada uma semana antes do início da administração da droga (Figura 7B). Os volumes administrados foram proporcionais aos pesos dos animais. Os testes experimentais foram realizados no final dos tratamentos de forma sequenciada, visando observar possíveis alterações relacionadas à locomoção (teste do campo aberto), ansiedade (teste do LCE) e memória (teste da esquiva inibitória) (Figura 7C).



Os animais (n=48) foram divididos em 6 grupos de 8 animais, sendo que as avaliações comportamentais ocorreram 30 min após a última administração da nicotina.

GRUPO 1: Animais submetidos à OF e tratados com solução salina.

GRUPO 2: Animais submetidos à OF e tratados com 0,1 mg/Kg/dia de nicotina (uma semana antes e uma semana pós-cirurgias)

GRUPO 3: Animais submetidos à OF e tratados com 0,1 mg/Kg/dia de nicotina (uma semana pós-cirurgias)

GRUPO 4: Animais submetidos à CLP e tratados com solução salina.

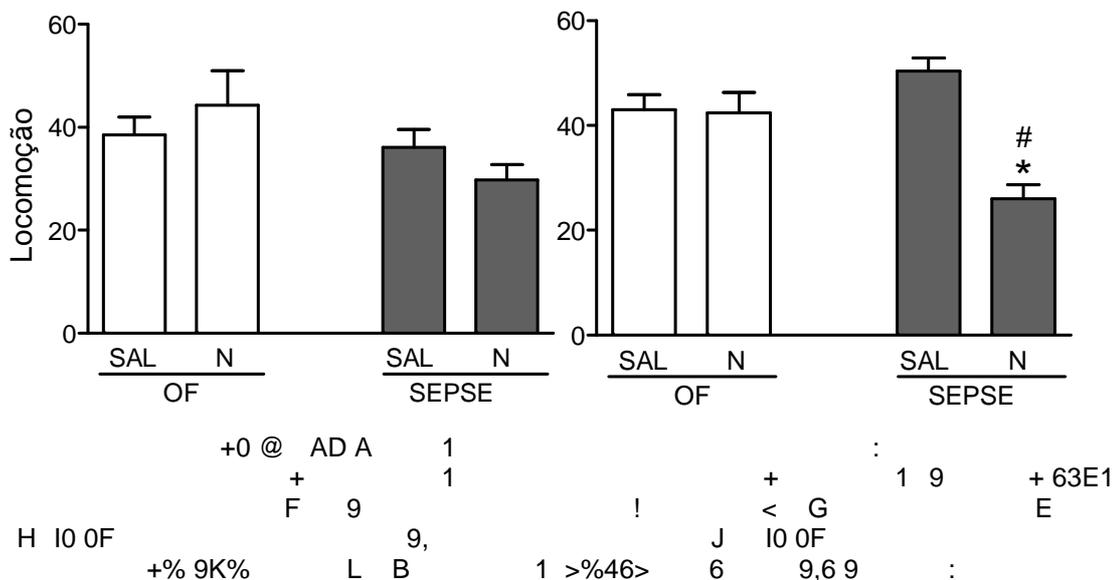
GRUPO 5: Animais submetidos à CLP e tratados com 0,1 mg/Kg/dia de nicotina (uma semana antes e uma semana pós-cirurgias).

GRUPO 6: Animais submetidos à CLP e tratados com 0,1 mg/Kg/dia de nicotina (uma semana pós-cirurgias).

4.3 RESULTADOS

4.3.1 Teste do Campo Aberto

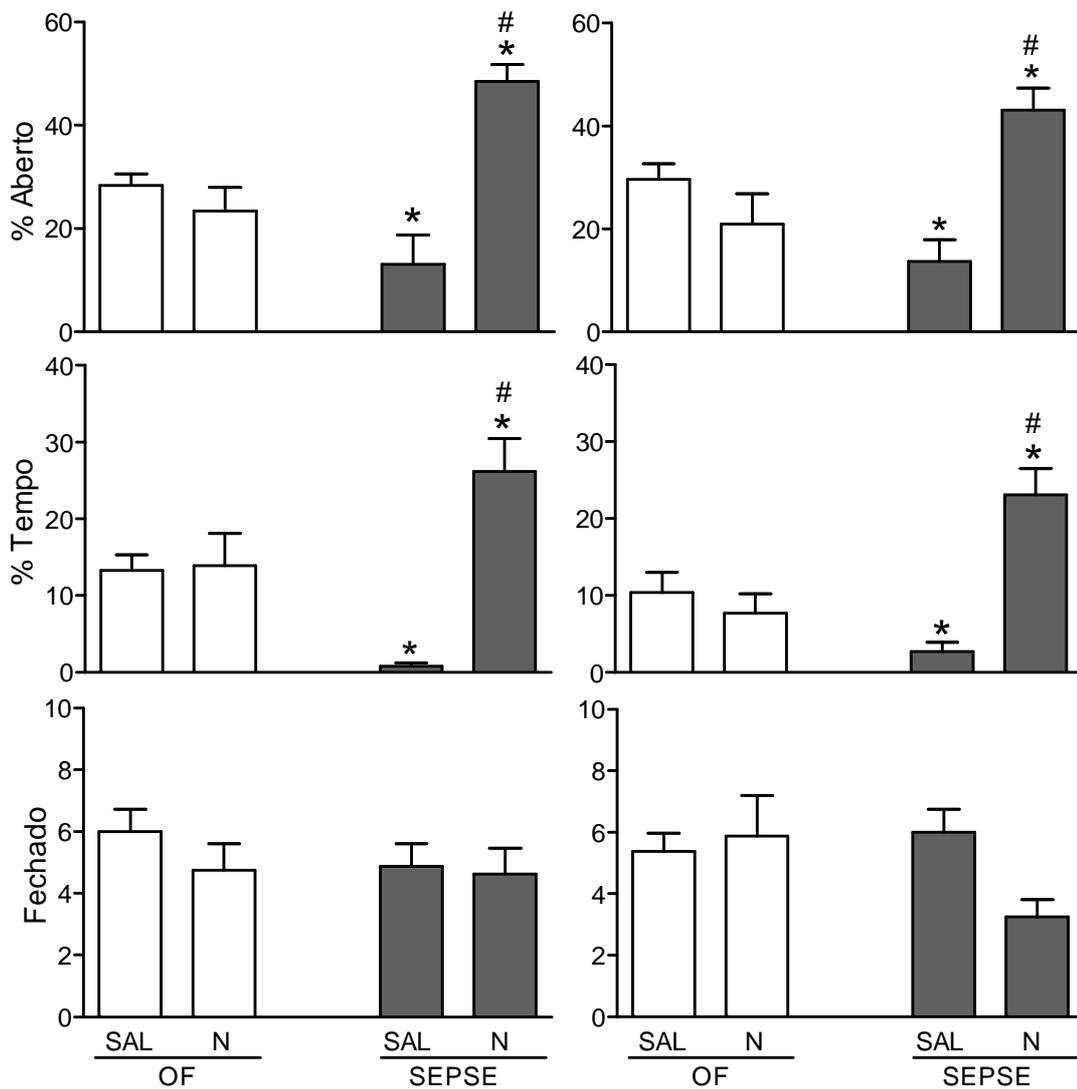
A sepse induzida experimentalmente não influenciou a locomoção dos animais quando comparados aos controles OF. Da mesma forma, não se observou nenhuma alteração quando a nicotina foi administrada uma semana antes da indução de sepse [$F_{(3,31)} = 1,871$; $p = 0,1574$]. No entanto, a locomoção foi influenciada quando os animais do grupo sepse receberam nicotina somente pelo período de uma semana pós-procedimentos cirúrgicos de indução de sepse [$F_{(3,31)} = 11,55$; $p = 0,0001$], conforme demonstrados nas Figuras 8A e 8B, respectivamente.



4.3.2 Teste do LCE

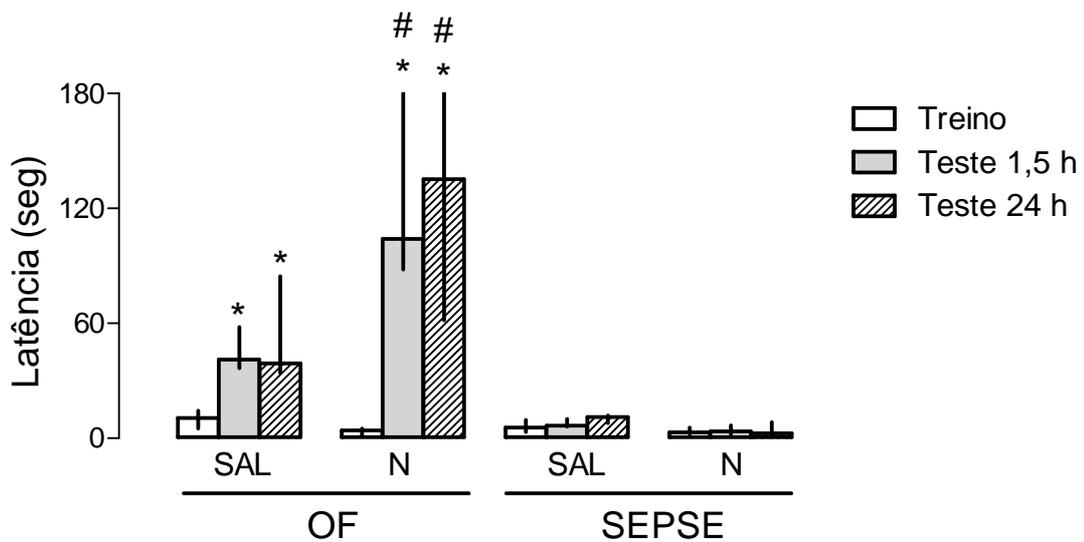
A sepse experimental induziu uma diminuição dos parâmetros indicativos de ansiedade quando os animais foram avaliados no teste do LCE: porcentagem de entradas (%EBA) e do tempo de permanência (%TBA) dos animais nos braços abertos do LCE. A frequência de EBF serviu para avaliar a locomoção dos animais (Figura 9). Esses parâmetros foram alterados pela administração s.c. de 0,1 mg/kg/dia de nicotina. A ANOVA de uma via detectou diferença estatística para a %EBA [$F_{(3,31)} = 12,78$; $p = 0,001$] e %TBA [$F_{(3,31)} = 10,67$; $p = 0,0001$]. O post hoc de

Newman Keuls mostrou que o grupo sepse que recebeu somente salina reduziu os referidos parâmetros quando comparados aos controles OF que receberam salina. Na segunda etapa dos experimentos, em que o objetivo foi investigar a ativação colinérgica pós-CLP, a ANOVA de uma via também detectou diferença estatística para o grupo de sepse na %EBA [$F_{(3,31)} = 8,088$; $p=0,0005$] e na %TBA [$F_{(3,31)} = 11,39$; $p=0,0001$]. A nicotina administrada durante duas ou uma semana melhorou esses parâmetros indicativos de ansiedade, sem interferir na EBF.



+0 @ AD A 1 :
 + < 4 1 + < 1
 9 + 63E1 (F - " 9
 ! < G E H IO OF J IO OF
 9, + % 9K% L B 1 > % 46 > 6 9,6
 9 :

O teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis revelou que os ratos sobreviventes à sepse tratados com salina durante 7 dias pós-cirurgias também exibiram um desempenho baixo na tarefa de esQUIVA inibitória, como indicado pela latência de permanência dos animais na plataforma, similar ao que se observou nas sessões de treino e testes [H(2, N=24) = 1,33; p=0,51]. No entanto, a avaliação realizada pelo Kruskal-Wallis revelou um efeito significativo da nicotina na latência dos animais na plataforma somente nos controles [H(2, N=24) = 15,86; p<0,001], mas não no grupo de sepse [H(2, N=24) = 0,10; p=0,95]. O teste de comparação múltipla de Dunn indicou que o tratamento pós-cirúrgicos com nicotina (0,1 mg/kg, s.c.), durante 7 dias consecutivos, não melhorou os prejuízos de MCD e MLD induzidos pela CLP em ratos (Figura 11).



9 +0 @ ADA 1 :
 + @ F"1 +/3"1 : #! @E0 9 !
 + H IO OF 1 M E A + 63E1 M
 9, +& 8 1 >%46 > 6 C J IO OF :
 9,6 9 :

4.4 DISCUSSÃO

No presente estudo observou-se que os ratos exibiram prejuízos de memória, bem como a ansiedade após a indução da sepse. Assim, a CLP parece representar um bom modelo para a investigação de alterações cognitivas e emocionais de longo prazo induzidas pela sepse. Mais importante, os resultados atuais fornecem novas evidências de que a administração repetida de nicotina pode melhorar os prejuízos de MCD e MLD e resposta ansiogênicas dos animais sobreviventes à sepse.

Nas últimas duas décadas, um progresso considerável ocorreu na compreensão da patogênese molecular e celular da sepse (Ivády et al., 2011; Russell et al., 2011). Neste contexto, Wang et al. (2004) publicaram um estudo demonstrando uma estratégia anti-inflamatória nicotínica para o tratamento da sepse, onde a nicotina, atuando nos receptores nicotínicos de acetilcolina- $\alpha 7$, atenuou a alta mobilidade da proteína HMGB1 na circulação e reduziu a produção de citocinas inflamatórias.

Consequentemente, a nicotina promoveu a estabilidade de uma peritonite letal (84-51%) em camundongos, mesmo quando o tratamento foi iniciado em 24 h após a indução da CLP (Wang et al., 2004). Mais recente, outros estudos reforçaram o potencial de receptores nicotínicos da acetilcolina como um alvo para tratamento da sepse, demonstrando que a ativação dos receptores $\alpha 7$ -nicotínicos da acetilcolina pela nicotina ou pelos agonistas seletivos levaram a um aumento na taxa de sobrevivência dos animais em modelo experimental de sepse (Pavlov et al., 2007; Tsoyi et al., 2011). Em contraste, van Westerloo et al. (2005) mostraram que a nicotina aumentou a mortalidade de camundongos em modelo experimental de sepse induzida por *Escherichia coli*.

Paralelamente a isso, Steiner et al. (2008) investigaram os efeitos da administração aguda e crônica de nicotina na inflamação sistêmica asséptica induzida por LPS e sepse induzida por CLP em camundongos C57BL/6. Curiosamente, a administração aguda de nicotina aumentou a taxa de sobrevivência na inflamação asséptica de 11 para 33% (possivelmente pela supressão da inflamação), mas piorou o resultado da sepse (possivelmente porque a supressão da

inflamação promoveu a proliferação microbiana). Cabe ressaltar que neste mesmo estudo os autores demonstraram que a administração crônica de nicotina (28 mg/kg, s.c), durante duas semanas, não afetou a sobrevivência em qualquer modelo de inflamação utilizado, possivelmente devido ao desenvolvimento de tolerância à nicotina (Steiner et al., 2008). Corroborando com esses achados descritos por Steiner et al. (2008), no presente estudo nenhum dos esquemas de nicotina (0,1 mg/kg, s.c.) utilizados no tratamento (antes e/ou após CLP) afetaram a taxa de sobrevivência no grupo sepse (50%).

Além disso, no presente estudo os animais sobreviventes à sepse não apresentaram prejuízos em suas atividades locomotoras como avaliadas pelo número de cruzamentos no campo aberto e o número de EBF no LCE. Esta observação é consistente com dados descritos anteriormente por outros grupos que utilizaram o mesmo modelo CLP em ratos (Barichello et al., 2005; Comim et al., 2011; Tuon et al., 2008a). Observou-se também uma diminuição acentuada da atividade locomotora no campo aberto (e uma clara tendência no LCE) quando a nicotina (0,1 mg/kg, s.c.) foi administrada durante 7 dias consecutivos pós-operatório em ratos sépticos .

Estudos anteriores investigando os efeitos da administração repetida de nicotina sobre a atividade locomotora de ratos tem fornecido resultados conflitantes. Por exemplo, há ampla evidência de que os efeitos da nicotina variam em função do sexo, da linhagem e do nível basal individual da excitação fisiológica (Rosecrans, 1995; Pehrson et al, 2008; Prus et al., 2008). No estudo de Prus et al. (2008), a administração repetida de nicotina (0,4 mg/kg, s.c.) inicialmente suprimiu a atividade espontânea no primeiro dia de tratamento e, então, aumentou a atividade após a primeira e segunda semanas de tratamento em ratos Lewis. O aumento da resposta para a nicotina, após a administração repetida, tem sido associado a um aumento da regulação dos receptores nicotínicos de acetilcolina (Marks et al., 1985; Wonnacott, 1990).

No presente estudo, a administração repetida de nicotina durante 7 dias consecutivos após a cirurgia induziu o efeito oposto (ou seja, diminuiu a atividade locomotora) nos ratos sobreviventes à sepse. Estes resultados podem ser difíceis de interpretar neste momento. Possíveis alterações nos níveis e/ou sensibilidade dos

receptores nicotínicos de acetilcolina no cérebro dos animais sobreviventes à sepse podem ser, pelo menos em parte, responsável pelos efeitos inesperados da referida droga na atividade locomotora e isso constitui um campo muito interessante que requer pesquisas adicionais.

No LCE, um teste amplamente utilizado para avaliar ansiedade em roedores (Carobrez e Bertoglio, 2005; Pellow et al., 1985), ratos sobreviventes à sepse exibiram uma marcante redução na exploração dos braços abertos, indicando um efeito ansiogênico induzido por CLP. Nosso estudo contrasta com dados prévios descritos por Barichello et al. (2007), onde os ratos que sobreviveram à CLP aumentaram o tempo de imobilidade no teste de nado forçado, comportamento sugestivos de depressão, mas não comportamento de ansiedade. Uma possível explicação para essas discrepâncias é o tempo diferente utilizado nesses estudos para a avaliação das respostas de ansiedade após a indução da CLP.

No presente estudo, foram testados no LCE os animais OF e animais sobreviventes à CLP em 7 dias após a indução da sepse, enquanto Barichello et al. (2007) realizaram essa avaliação em um período maior (10 dias após a cirurgia). Portanto, uma recuperação do comportamento de ansiedade dependente de um tempo mais curto após a indução da sepse quando comparada com aquela descrita para prejuízos de memória e comportamento de depressão (que persistem por, pelo menos, 30 dias após CLP) (Barichello et al, 2007;. Tuon et al., 2008a) pode explicar, pelo menos em parte, essas discrepâncias.

Cabe enfatizar que ambos os esquemas de tratamento repetido com nicotina (antes e/ou após CLP) melhorou a resposta ansiogênica induzida pela sepse em ratos. Os efeitos da nicotina na ansiedade em animais laboratoriais são complexos, uma vez que pode induzir efeitos ansiolíticos ou ansiogênicos em diferentes testes comportamentais. Estas diferenças dependem da dose, tempo entre as injeções e testes, via de administração e teste comportamental utilizados (File et al., 2000; Irvine et al., 2001;. Salas et al, 2003).

Irvine et al. (2001) examinaram os efeitos da nicotina (0,1 mg/kg, s.c.), a mesma dose utilizada no presente estudo, 5 e 30 min após a injeção de uma dose única e após um período de tratamento crônico no comportamento de ansiedade em

ratos no LCE. A nicotina (30 min após a injeção) teve um efeito ansiogênico significativo, mas desenvolveu tolerância para este efeito ansiogênico após 7 dias de tratamento com nicotina (0,1 mg/kg/dia). Por outro lado, 5 min após a injeção aguda, a nicotina (0,1 mg/kg) foi ineficaz, mas após 7 dias de tratamento foi observado um significativo efeito ansiolítico. Mais uma vez, a tolerância foi desenvolvida para este efeito ansiolítico após 14 dias de tratamento repetido (Irvine et al., 2001).

Cabe destacar que as alterações de comportamento referentes à ansiedade sugeriram que o efeito ansiolítico foi específico e não sedativo - o que foi comprovado pela ausência de efeito na atividade locomotora e também pela não interferência na frequência de EBF do labirinto. A ausência de tigmotaxia nos braços abertos impede um comportamento defensivo dos ratos contra os seus predadores. Com isso, a literatura nos mostra que os ratos tem preferência pelos braços fechados devido a presença de paredes verticais altas (Treit et al., 1993).

Portanto, os resultados do presente estudo corroboram com esses achados anteriores, uma vez que a administração repetida de nicotina (0,1 mg/kg/dia, s.c.) não afetou o comportamento de ansiedade dos ratos controles, indicando o desenvolvimento de tolerância aos efeitos da nicotina na ansiedade mediante a administração repetida da substância. Para conhecimento, este é o primeiro relato em que ratos sobreviventes à sepse não desenvolveram tolerância a ação ansiolítica induzida pela nicotina sobre a administração repetida de drogas. Visto que as estruturas neuroanatômicas e as vias subjacentes ao desenvolvimento de tolerância ao efeito ansiolítico de nicotina permanecem incertas, não é surpreendente que o mecanismo exato deste fenômeno afetado pela sepse ainda seja desconhecido.

Estudos anteriores demonstraram que ratos sobreviventes à sepse mostraram déficits de aprendizagem e de memória observados em diferentes paradigmas comportamentais que persistem por, pelo menos, 30 dias após a indução CLP (Barichello et al, 2005, 2007; Comim et al., 2011; Tuon et al, 2008a). De acordo com esses achados anteriores, no presente estudo os ratos sobreviventes à sepse tratados com veículo exibiram um desempenho baixo na tarefa de esquiva inibitória, como indicado pela latência similar no treinamento e

sessões de testes.

Uma vez que a sepse pode afetar processamento sensorial durante o treinamento, tais como reatividade dos ratos ao choque nas patas, ao invés de memória foi avaliado os efeitos da sepse na sensibilidade ao choque nas patas em todos os grupos e não houve diferenças significativas entre os grupos no que se refere aos limiares nociceptivos observados pela esquiva ou salto (dados não apresentados), mostrando que a sepse não afetou a reatividade do animal ao choque na pata, de acordo com a literatura anterior (Tuon et al., 2008a).

Os mecanismos envolvidos nos déficits cognitivos induzidos pela sepse permanecem obscuros. Tuon et al. (2008b) avaliaram os efeitos de diferentes estimuladores de memória em ratos sobreviventes à sepse no teste de esquiva inibitória e demonstraram que a epinefrina, naloxona, dexametasona e glicose reverteram os déficits de MLD no grupo sepse 10 e 30 dias após a cirurgia. Aqui, complementa-se a literatura anterior demonstrando que a nicotina (0,1 mg/kg/dia, s.c.) foi capaz de melhorar os déficits da MCD e MLD observados em sobreviventes de sepse somente quando administrada durante duas semanas consecutivas (antes e após CLP).

Nossos achados estão de acordo com resultados prévios obtidos em animais experimentais e em humanos que demonstram que a nicotina aumenta a aprendizagem e desempenho da memória em diferentes tarefas (Levin e Rezvani, 2000). Notavelmente, a infusão crônica de nicotina tem se mostrado eficaz para melhorar o desempenho de ratos em paradigmas de aprendizagem e memória (Levin, 1993). Portanto, nossas descobertas, juntamente com essas literaturas anteriores, sugerem que a ativação de receptores nicotínicos da acetilcolina pelos agonistas seletivos ou pela nicotina pode ser uma abordagem viável para combater déficits cognitivos em sobreviventes de sepse.

4.5 CONCLUSÕES

Nossos resultados reforçam pesquisas prévias demonstrando que o modelo CLP representa uma boa ferramenta de pesquisa para o estudo das alterações comportamentais secundárias à sepse. Mais importante, os dados atuais indicam que a administração repetida de nicotina não altera a taxa de sobrevivência em ratos submetidos à CLP, mas pode melhorar déficits de MLD e as respostas ansiogênicas nos animais sobreviventes à sepse.

Portanto, os resultados atuais trazem a perspectiva de que a ativação colinérgica e os agonistas seletivos para os receptores nicotínicos da acetilcolina podem representar potenciais alternativas para melhorar os prejuízos comportamentais e cognitivos de longa duração nos sobreviventes à sepse. Pesquisas adicionais são necessárias para esclarecer os prováveis mecanismos pelos quais a administração repetida de nicotina melhora os prejuízos cognitivos e emocionais nos animais sobreviventes à sepse. É também necessário descobrir se existe alguma interação entre os sistemas colinérgicos e outros neurotransmissores, tais como a dopamina e a noradrenalina, neste efeito da nicotina.

--- 5. CAPITULO II ---

EFEITOS NEUROPROTETORES DO EXTRATO DE *Melissa
officinalis* NA SEPSE EXPERIMENTAL

5.1 INTRODUÇÃO

5.1.1 Plantas medicinais: aspectos gerais

As plantas foram extensivamente utilizadas pelas antigas civilizações da Mesopotâmia, Egito, Grécia, Índia e China para a manutenção da saúde (Lorenzi e Matos, 2002; Newman et al., 2000; Berlin, 2001). Tornaram-se populares por meio das gerações e continuaram a ser usadas nas mais variadas indicações. O uso de medicamentos derivados de plantas auxilia no tratamento e prevenção de doenças, o que vem sendo documentado ao longo de cinco milênios (Musthaba et al., 2010; Perry e Howes, 2011; Rehman et al., 1999).

No Brasil, por exemplo, a inexistência de literatura tradicional alicerçou a medicina popular em informações verbais transmitidas pelos índios, europeus e negros, e na influência de outras populações imigrantes (Borrás, 2003). Seus consumos foram intensificados por estarem disponíveis em qualquer centro comercial popular e farmácias, ou seja, de fácil acesso e custo acessível. Esse uso, entretanto, foi cada vez mais sendo reduzido devido ao aperfeiçoamento da síntese química (Berg, 1993). Com o passar dos anos e o aparecimento de sérias reações adversas devido ao uso dos produtos sintéticos, a população novamente começou a redescobrir as plantas medicinais e procurar nelas a solução para seus males (Demain, 2009; Pinn, 2001).

Nosso país ganha destaque mundial do consumo dessas terapias naturais pela riqueza da flora diversificada com o território que inclui cinco principais biomas: a Floresta Amazônica, o Cerrado, a Mata Atlântica, o Pantanal e a Caatinga. Nestes biomas também é observada uma diversidade de comunidades com culturas diferentes, onde algumas delas ainda se fazem valer o uso de medicina tradicional, que também é passado entre as gerações para agora encontrar-se amplamente difundida entre as populações de todos os biomas citados anteriormente, apesar de poucas comprovações científicas (Giorgetti et al., 2007).

A raridade de fitoterápicos derivados de nossa flora brasileira é atribuída a várias razões que vão desde a ausência de incentivos financeiros do governo para a pesquisa de produtos naturais até a dificuldade nas legislações brasileiras no que

concerne ao estudo de plantas medicinais (Giorgetti et al., 2007). Este panorama vem mudando ao longo dos últimos anos graças as interações das indústrias farmacêuticas com as universidades financiando projetos de grande escala e maior conscientização quanto a importância da pesquisa clínica para maior segurança e efetividade do produto (Rodrigues, 2006 ; Giorgetti et al., 2007)

Cabe ressaltar que as plantas medicinais só podem ser consideradas medicamentos após sua inclusão na farmacopéia. Para isso, são necessários diversos estudos, desde os farmacológicos, pré-clínicos e toxicológicos até os químicos, visando o isolamento e a caracterização dos princípios ativos (Lorenzi e Matos, 2002; Lucena et al., 2010). Neste sentido, medicamentos como a morfina, os digitálicos, a quinina e as estatinas foram desenvolvidos direta e indiretamente de fontes naturais (Yunes e Calixto, 2001).

A partir do ponto de vista fitoquímico, os mais importantes constituintes químicos das plantas e que exercem atividades no SNC são os flavonóides, alcalóides, ácidos fenólicos, taninos e óleos essenciais. Alguns flavonóides apresentam efeitos neuroprotetores do SNC (Spencer et al., 2012). Os alcalóides são relevantes no tratamento de distúrbios cognitivos, pelo aumento da função colinérgica no SNC (Howes e Perry, 2011). Os componentes fenólicos protegem os neurônios do estresse oxidativo (Kelsey et al., 2010). Muitos taninos mostraram efeitos anticonvulsivantes (Dos Santos et al., 2005). Por fim, algumas plantas aromáticas com alta concentração de óleos essenciais são utilizadas no tratamento de doenças do SNC comuns em regiões tropicais (Freire et al, 2006; Ozturk et al., 2002).

A utilização de plantas nativas das Américas difundiu-se devido à grande importância terapêutica a elas atribuída pela população, como é o caso do boldo (*Peumus boldus* Mol.), a macela (*Acchyroclines satureioides* D.C.), o quebra-pedra (*Phyllanthus nirurii* L. e *Phyllanthus urinaria* L). As plantas de origem européia, trazidas pelos colonizadores, também tiveram rápida difusão entre o povo brasileiro, como foi o caso da camomila (*Matricaria chamomilla* L.), da malva (*Malva sylvestris* L.) e da melissa (*Melissa officinalis* L.) (Borrás, 2003; Revilla, 2001).

5.1.2 Melissa officinalis

A *Melissa officinalis*, popularmente conhecida como erva-cidreira, devido ao seu aroma de limão ainda tem muito a ser explorada em distúrbios relacionados ao SNC. Esta erva da família Labiatae é cultivada em inúmeros países, inclusive no Brasil, sendo comercializada principalmente na forma de chá, em conjunto com outras espécies de ervas. As folhas dessa espécie são ricas em taninos, flavonóides e óleos essenciais e tem sido usadas na medicina popular na forma de infusão (Teske e Trentini, 1994) por suas propriedades antimicrobianas e antioxidantes (Mímica-Dukic et al., 2004).

Foram observados efeitos dos extratos de *Melissa officinalis* na redução dos níveis de peroxidação lipídica e na redução nos níveis das transaminases hepáticas, tanto de aspartato aminotransferase (TGO), quanto da alanina aminotransferase (TGP) em estudo com ratos hiperlipidêmicos (Bolkent et al., 2005). Outros estudos mostraram efeito do seu óleo essencial como antitumoral (Sousa et al., 2004), e também ação na resposta imune do tipo humoral e celular em ratos (Drozd e Anuszevska, 2003).

Em termo dos seus efeitos no SNC, essa planta já foi implicada na modulação dos processos cognitivos e do humor (Akhondzadeh et al., 2003; Kennedy et al., 2002), podendo ter um efeito positivo sobre os déficits cognitivos observados na doença de Alzheimer. Esta observação foi reforçada pelo fato da *Melissa officinalis* poder se ligar aos receptores nicotínicos e muscarínicos no SNC (Wake et al., 2000), além de também poder inibir a GABA transaminase, uma enzima alvo no tratamento da epilepsia e outros distúrbios neurológicos relacionados em cérebros de ratos, graças principalmente à presença do ácido rosmarínico (Awad et al., 2009).

O ácido rosmarínico é encontrado em uma variedade de famílias e espécies de plantas, sendo bem conhecido pela sua propriedade antioxidante e antimicrobiana. Ele é eliminado da circulação sanguínea de forma rápida e sua toxicidade é muito baixa em camundongos, apresentando tanto ações antibacteriana, antiviral e antimutagênica, quanto ações adstringente, antioxidante e

antiinflamatória, por inibir as lipooxigenases e ciclooxigenases (Pereira et al., 2005; Petersen e Simmonds, 2003).

Além disso, também já foi detectada em roedores e humanos uma diminuição de níveis elevados de ansiedade, estresse e distúrbios do sono, não acarretando efeitos adversos significativos ou sintomas de toxicidade através de um largo espectro de doses (Coleta et al., 2001; Kennedy et al., 2004). Apesar de muitas pesquisas estarem sendo realizadas diretamente em humanos, muitas lacunas ainda se encontram em aberto para o entendimento dos mecanismos de ação que justificam as respostas comportamentais decorrentes do uso da *Melissa officinalis*.

Atualmente, as terapias experimentais na sepse tem sido alvo de pesquisas a fim de entender a fisiopatologia da mesma, bem como melhorar a sobrevida dos pacientes. Elas tem representado um avanço na terapia de suporte do paciente séptico e no desenvolvimento de novas drogas. Apesar disso, os índices de mortalidade por sepse grave ainda são altos (Antanopoulou e Giamarellos-Bourboulis, 2011). Estimativas sugerem que cerca de 40% dos pacientes com sepse desenvolvem choque séptico, cuja mortalidade é maior, ficando entre 70 e 90% (Karima et al., 1999; Hanna, 2003).

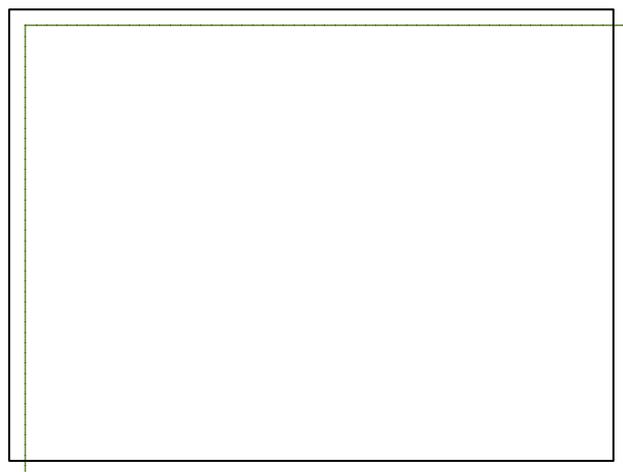
Na tentativa de diminuir a mortalidade provocada por esta doença frequentemente fatal, pesquisadores tem estudado vários tratamentos como anticorpos contra endotoxinas, anticorpos contra o TNF- α , anticorpos contra a IL-1 β , antioxidantes, uso da proteína C ativada, inibidores de óxido nítrico sintase, corticosteróides, antibióticos de última geração e outros (Antanopoulou e Giamarellos-Bourboulis, 2011). No entanto, nenhuma das referidas terapias pode ser considerada 100% eficaz para interferir no quadro geral garantindo uma total segurança e evitando as consequências das sequelas.

Portanto, diante desse cenário, esta pesquisa respaldada por achados da literatura e dados observados em nosso grupo de pesquisa visou explorar as propriedades terapêuticas do extrato de *Melissa officinalis* nas alterações comportamentais reacionadas à ansiedade e alterações cognitivas decorrentes da sepse experimental induzida em ratos.

5.2 MATERIAIS E MÉTODOS

5.2.1 Preparo e regime de tratamento do extrato de *Melissa officinalis*

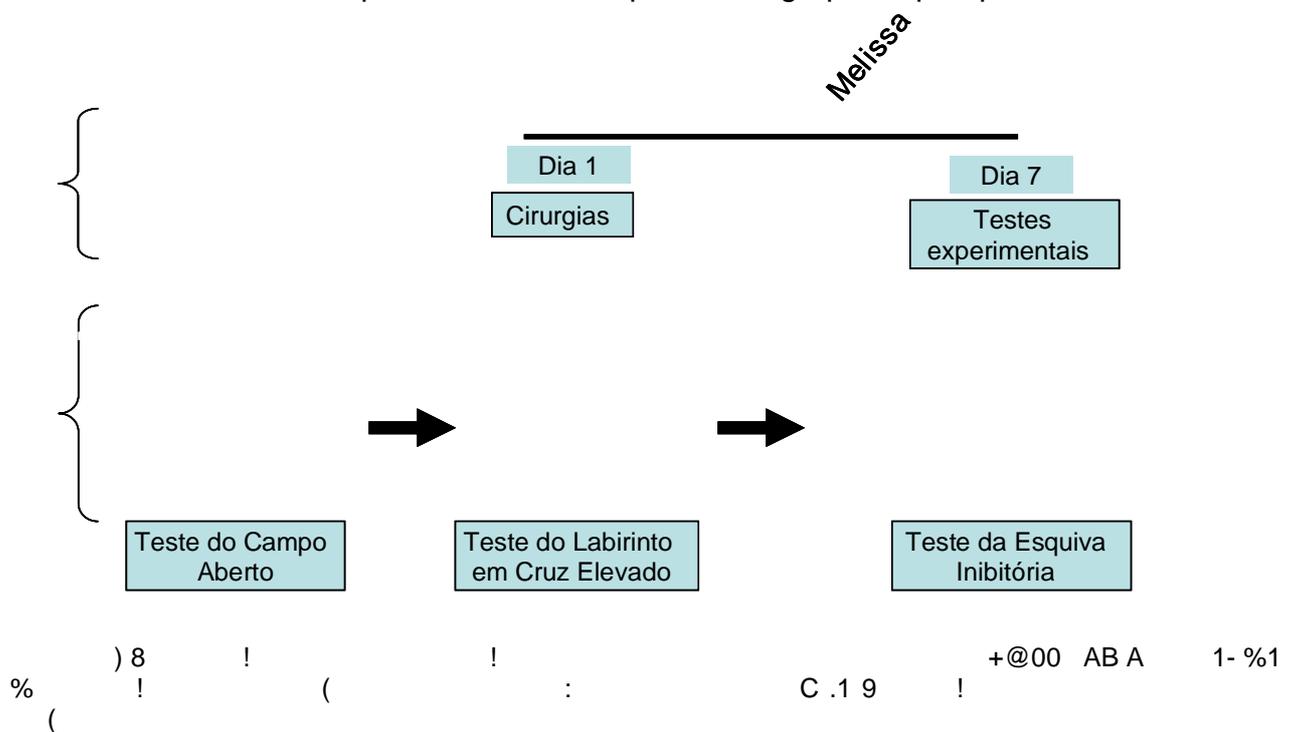
Após a identificação da espécie de *Melissa officinalis* (Figura 12), as folhas foram retiradas para a secagem pela Centroflora (Botucatu, Brasil). As folhas secas foram separadas de seus caules e secas sob a luz solar. Após toda a água ter sido evaporada, elas foram moídas. Cerca de 300 mg de folhas secas moídas foram colocadas em um frasco com etiletanol a 95%, em quantidade suficiente para cobri-las e mantidas nesse procedimento durante sete dias. O frasco com o material foi vedado para evitar a evaporação do álcool. Após uma semana, o material 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).



" +, - LLL N L 1

A concentração de 100 mg/mL do extratos alcoólico de *Melissa officinalis* foi preparada com o auxílio das seguintes substâncias: 150 mL de Tween 80, 150 mL de álcool e 150 mL de DMSO, totalizando 450 mL de solução. O extrato foi misturado com a solução de solventes na proporção de 1:1. A seguir, foi adicionada salina (0,9% NaCl) lentamente até completar o volume de 4 mL, sendo que a mistura foi realizada de forma vigorosa para conseguir a maior homogeneização possível da preparação e evitar precipitações.

A solução foi administrada na dose de 100 mg/kg/dia, durante uma semana pós-cirurgias (Figura 13A). Os testes experimentais foram realizados ao final do tratamento (Figura 13B). A correlação de preparação do extrato foi baseada no princípio de que 1 mL do extrato foi dado para cada 1 kg do animal. Todos os tratamentos foram feitos por via oral (v.o.), através do procedimento de gavagem, para garantir que o animal receberia a dose total administrada sem que houvesse perda. Essa seria também uma forma de reproduzir, ao máximo, a forma de administração oral usada por humanos nas pesquisas clínicas. A dose selecionada foi baseada em estudos prévios realizados por nosso grupo de pesquisa.



Para esses experimentos os animais (n=60) foram divididos em 6 grupos de 10 animais cada.

GRUPO 1: Animais submetidos à OF e tratados com solução salina.

GRUPO 2: Animais submetidos à OF e tratados com diazepam (DZP).

GRUPO 3: Animais submetidos à OF e tratados com Melissa officinalis (100 mg/kg).

GRUPO 4: Animais submetidos à CLP e tratados com solução salina.

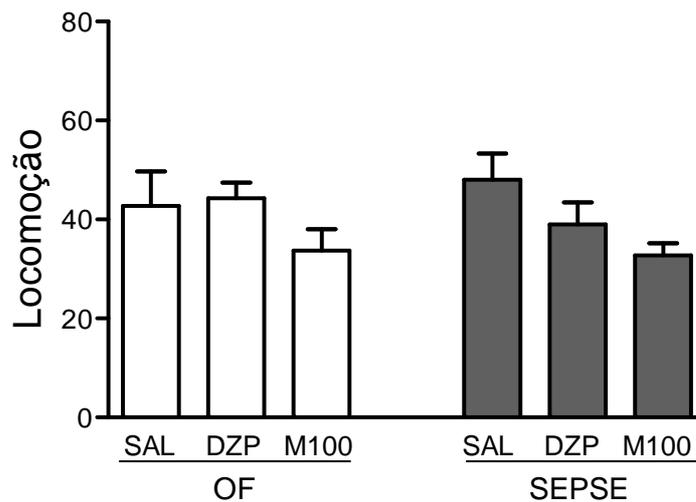
GRUPO 5: Animais submetidos à CLP e tratados com diazepam (DZP).

GRUPO 6: Animais submetidos à CLP e tratados com Melissa officinalis (100 mg/kg).

5.3 RESULTADOS

5.3.1 Teste do Campo Aberto

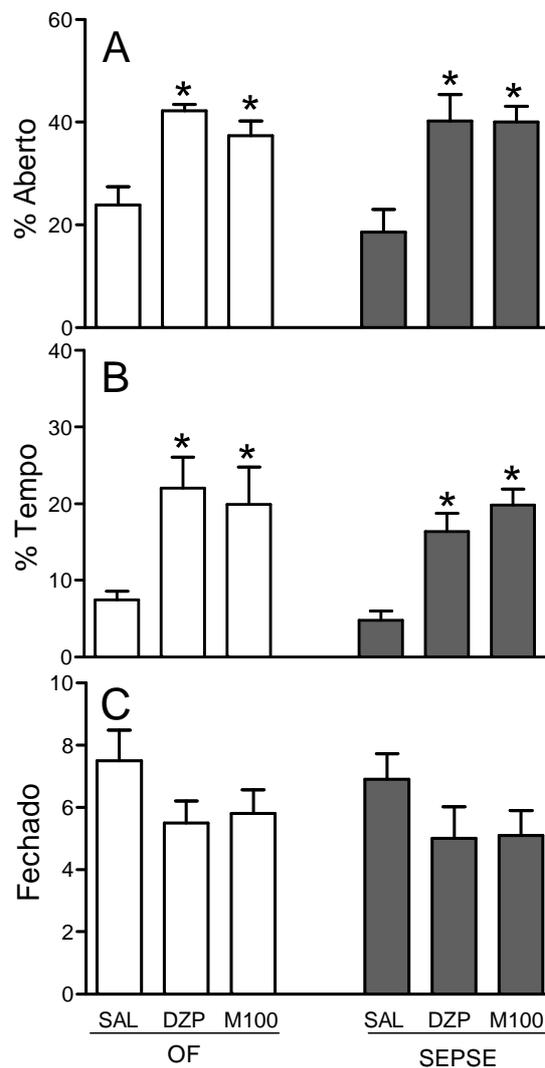
Os resultados mostram que não houve diferença significativa entre os resultados do grupo controle em relação ao grupo que teve sepse induzida. Os animais administrados com a *Melissa officinalis* (100mg/kg) não apresentaram modificação no número de ambulação quando comparados aos animais controles, da mesma forma que o grupo administrado com o benzodiazepínico DZP também não apresentou alteração quando comparado ao controle que teve administração de salina (Figura 14).



+@00 ABA 1 \$ (+@0 ADA 1 !
 + 6O01 & F 9 % ! < G
 @0 9,6 9 : >%46 > 8P56 8 (Q@006 @00 AD !

5.3.2 Teste do Labirinto em cruz elevado

Neste teste usado para avaliar o comportamento de ansiedade, o DZP foi usado como controle positivo. O extrato de *Melissa officinalis* administrado na dose de 100mg/kg apresentou atividade ansiolítica similar à apresentada pelo benzodiazepínico, o que foi demonstrado pelo aumento da % EBA e % TBA, quando comparado ao grupo controle. As EBF não apresentaram alterações significativas (Figura 15).

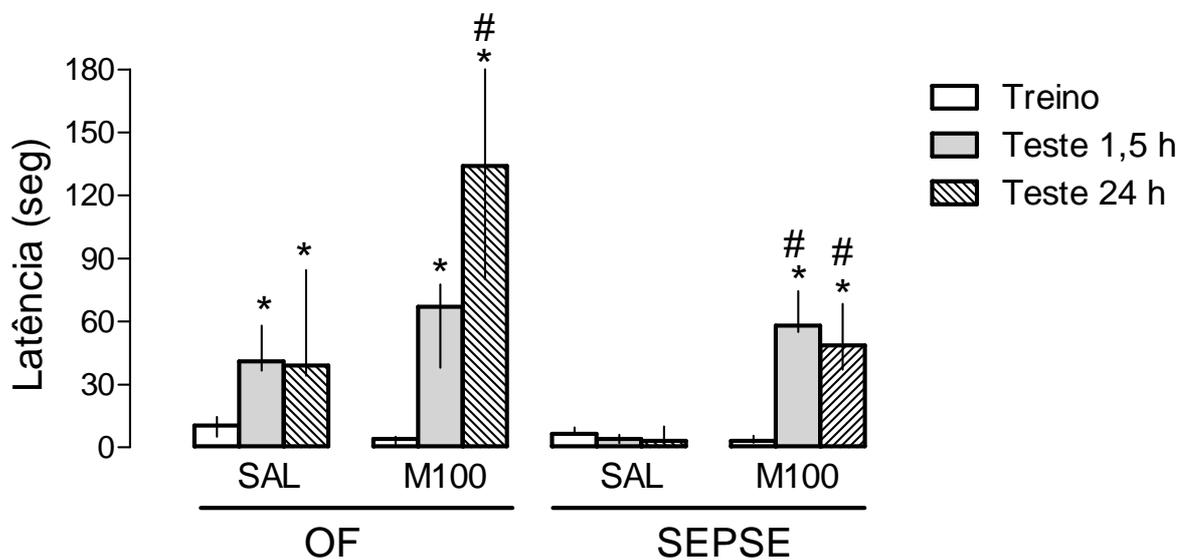


+@00 ABA 1 \$ (+@0 ADA 1 !
 +6001 & 4 (: F %
 +%1 +.1 " +1
 < G @0 H R0 OF
 9, +%9K% L B 1 9,6 9 : >%46 > 8P5 6 8 (
 Q@006 @00 AD !

5.3.3 Esquiva inibitória do tipo step-down

Os efeitos da administração do extrato de *Melissa officinalis* (100 mg/kg/dia, v.o.) durante 7 dias consecutivos na MCD e MLD em ratos sobreviventes à CLP e os OF estão demonstrados no Figura 16. O teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis revelou que os ratos sobreviventes à sepse que foram tratados com salina não exibiram uma bom desempenho na esquiva inibitória, como indicada pela latência dos animais na plataforma nas sessões de treinos e testes [H(2, N = 24) = 4,50; p = 0,10].

Por outro lado, o teste de Kruskal-Wallis revelou um efeito significativo com o tratamento do extrato nas latência dos animais na plataforma tanto no grupo OF quanto no grupo de sepse. Subsequentemente, o teste de comparação múltipla de Dunn indicou que o extrato aumentou a latência dos animais sobreviventes à sepse e OF na plataforma quando avaliados 1,5 h e 24 h após os treinos.



+@00 AB A 1 \$ (+@0 AD A 1 !
 + 6O01 : %
 +/3"1 : #! @E0 9 ! +@ F"1
 1 M : M @0 H + IO OF
 M : : Cj IO OF 8 1 9,6 9 : >%46 > Q@006 @00
 AD ! : - 9, +B D S

5.4 DISCUSSÃO

Os resultados demonstraram que ratos sobreviventes à sepse experimental podem apresentar comportamentos sugestivos de ansiedade e prejuízos de memória compatíveis com os dados encontrados na literatura para seres humanos. O extrato de *Melissa officinalis* administrado após a indução de sepse pode interferir de forma positiva nos parâmetros indicativos de ansiedade, uma vez que a sua administração subcrônica, na dose 100 mg/kg, apresentou atividade ansiolítica e melhora cognitiva nos animais sobreviventes à sepse induzida, demonstradas pelo aumento da %EBA e %TBF no teste de LCE e aumento do tempo de latência dos animais na plataforma do teste da esQUIVA inibitória, respectivamente.

Pesquisadores tem observado que por conta da ausência de uma homeostasia adequada, os sobreviventes à sepse apresentam déficits cognitivos de longo-prazo incluindo alterações de memória, atenção, concentração e perda global de função cognitiva, além de várias alterações comportamentais que podem ser secundárias ao quadro geral da infecção, que são sequelas que restringem a qualidade de vida dos sobreviventes (Granja et al., 2004). A presente pesquisa, portanto, chamou a atenção para a importância de estudos dos mecanismos pelos quais ocorrem essas alterações e novas alternativas de tratamento.

Nossos estudos mostraram que ratos que sobreviveram à sepse após um período de 7 dias da CLP, apresentaram uma redução na %EBA e % TBA do LCE, mostrando que esta resposta foi sugestiva de ansiedade (ansioGênica). Tal resultado pode ser comprovado pelo fato de não se ter observada a interferência na locomoção tanto na EBF do LCE quanto pelos números de ambulação dos animais avaliados no teste do campo aberto.

Conforme já comentando anteriormente, o teste do LCE encontra-se bem validado na literatura, sendo um dos mais utilizado modelos de ansiedade experimental (Carobrez e Bertoglio, 2005; Treit et al., 1993). Ele é útil para investigar propriedades ansiolíticas e/ou ansioGênicas de substâncias em fase de experimentação. No que diz respeito aos resultados obtidos, a literatura mostra que

ratos tem preferência natural pelos braços fechados, devido a presença de paredes verticais altas. Uma esquia dos braços abertos do LCE é em decorrência da ausência dessas paredes, que impede o seu comportamento de tigmotaxia, o que acaba favorecendo um comportamento defensivo contra seus predadores (Treit et al., 1993).

Com o objetivo de tratar a ansiedade patológica, por meio do uso de alternativas farmacológicas que vão agir nas diversas estruturas do sistema límbico e neurotransmissores, os benzodiazepínicos destacam-se pela sua ampla margem de segurança, ainda que não sejam destituídos de efeitos adversos ou de potencial de abuso. Sua atividade ansiolítica é alcançada com doses que não induzem depressão respiratória clinicamente significativa. O DZP é o principal representante dessa classe (Lader, 2011; Möhler, 2011).

O DZP, portanto, se constitui em boa alternativa terapêutica para o tratamento da ansiedade e um excelente controle positivo na pesquisa básica para avaliar substâncias com prováveis propriedades ansiolíticas. Neste estudo fizemos uso do benzodiazepínico mencionado, que demonstrou alteração significativa na %EBA e %TBA. Além disso, a dose utilizada mostrou não interferir na locomoção dos animais, um fator importante para garantir a ausência de efeito sedativo que poderia estar influenciando na resposta ansiolítica avaliada no LCE.

A resposta dos animais frente as sequelas provocadas pela sepse experimental sofreu interferência do extrato de Melissa administrado durante uma semana pós-sepse, quando aumentou a %EBA e %TBA dos animais avaliados no teste do LCE, juntamente com a ausência de efeito na atividade locomotora e ausência de interferência na EBF.

Os efeitos ansiolíticos e de alteração de humor provocada pela Melissa officinalis tem sido bem documentados, apesar dos mecanismos de ação não estarem claros. Até agora apenas alguns estudos tem investigado os efeitos centrais da Melissa officinalis. Trabalho anteriormente desenvolvido pelo Soulimani et al. (1991) demonstrou as ações sedativas da erva-cidreira em camundongos e sua atividade foi atribuída a solução hidroalcoólica ao invés da extração dos óleos essenciais. Efeitos colinérgicos foram observados em extratos alcoólicos que tinham

afinidades pelos receptores nicotínicos e muscarínicos do cérebro humano (Wake et al., 2000; Kennedy et al., 2003).

Uma vez que alguns desses efeitos parecem não ser específicos dos receptores colinérgicos, mais tarde foi sugerido outro mecanismo importante que poderia estar envolvido com os efeitos da Melissa. Salah e Jager (2005) e Jager et al. (2006) mostraram afinidade moderada do extrato etanólico de Melissa officinalis para o sítio benzodiazepínico do receptor GABA_A, e nenhuma atividade foi vista no transmissor de serotonina (5-HT). Estudo relata que a referida espécie também inibe a GABA-T e o principal componente para essa atividade é o ácido rosmarínico uma vez que está presente em quantidades muito elevadas no extrato da espécie avaliada (Awad et al., 2009).

A Melissa officinalis, até então, tem se mostrado ser segura com nenhum efeito adverso associado ao seu uso (Wong et al., 1998), o que explica as razões do seu consumo direto em humanos. Como nenhum efeito tóxico foi observado durante o tratamento com a dose utilizada do extrato, pode-se sugerir que sua administração subcrônica pode ser considerada relativamente segura. Esses dados eram de se esperar visto que em humanos o consumo do extrato durante 4 meses também não apresentou níveis de toxicidade consideráveis (Akhondzadeh et al., 2003).

No que diz respeito aos processos cognitivos, uma alternativa muito utilizada para investigar MCD e MLD é o teste da esQUIVA inibitória do tipo step-down (Azizbeigi et al., 2011; Castro et al., 2012; Piri e Zarrindast., 2011). Neste teste há a observação de dois tipos de memória, a MCD (1,5 h após a sessão treino) e a MLD (24 h após a sessão treino). Na presente pesquisa observou-se que os animais submetidos à sepse experimental tiveram um comprometimento tanto da MCD quanto da MLD, indicados pela redução do tempo de latência na plataforma mesmo após o estímulo aversivo proporcionado pelo choque de 1 mA.

Estudo realizado com humanos jovens demonstrou que os efeitos cognitivos da Melissa officinalis são dependentes da dose e do tempo de tratamento, bem como preparações derivadas da mesma espécie podem apresentar propriedades diferentes dependendo do processo utilizado na preparação das amostras (Kennedy et al., 2003). A referida espécie quanto utilizada em conjunto com Valeriana

officinalis apresentou melhora na qualidade dos sonos em indivíduos normais e nos que apresentaram algum tipo de distúrbio do sono (Dressing et al., 1992).

Pesquisadores tem observado que sobreviventes à sepse, provavelmente por conta da ausência de uma homeostasia adequada, apresentam deficiência cognitiva a longo-prazo incluindo alterações de memória, atenção, concentração e perda global de função cognitiva além de várias alterações comportamentais que podem ser secundárias às alterações durante o desenvolvimento da sepse (Cassol-Jr et al., 2010; Granja et al., 2004). Estas alterações são sequelas da sepse que restringem a qualidade de vida dos sobreviventes. Isso leva à importância de estudos dos mecanismos pelos quais ocorrem essas alterações e alternativas de tratamento.

Estes resultados associados aos observados no LCE nos levam a supor uma possível interação de diferentes comportamentos relacionados à ansiedade, depressão e memória que, provavelmente, encontram-se associados. Ainda que nesta pesquisa a depressão não tenha sido investigada, sugere-se que ela esteja entre um dos principais quadros manifestados pelos pacientes sobreviventes à sepse. Portanto, a interação sugerida deve-se ao fato de que a ansiedade e os prejuízos cognitivos podem ser frequentemente observados na depressão e outros distúrbios do humor (Roiser et al., 2012) – comportamentos esses implicados com a sepse.

5.5 CONCLUSÕES

O extrato alcoólico de *Melissa officinalis* na dose administrada não afetou o comportamento dos animais no campo aberto e nem nos braços fechados do LCE indicando atividade ansiolítica encontrada pelo número de entradas e tempo de permanência nos braços abertos do LCE. Os resultados encontrados no teste de esQUIVA inibitória demonstraram um aumento do tempo de latência dos animais na plataforma indicando ação da *Melissa* tanto na MCD quanto na MLD.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As pesquisas na área molecular tem levado a sugerir várias hipóteses para justificar todos esses eventos relacionados às alterações comportamentais e cognitivas, em especial no que diz respeito à desregulação dos níveis de diferentes neurotransmissores complementando o que já é descrito na literatura. A ansiedade associada à depressão pode estar atribuída principalmente à função serotoninérgica, enquanto que a perda de prazer e motivação é provável que estejam correlacionadas às funções dopaminérgicas e noradrenérgicas (Nutt et al., 2007). Os sintomas cognitivos associados à depressão, por sua vez, parecem ter influência de uma desregulação colinérgica (Dagytè et al., 2011).

Muitas dessas observações comportamentais e cognitivas também foram relatadas em pacientes que sobreviveram à sepse, cujas manifestações não se faziam presentes antes do referido quadro ter sido instalado. Os achados neste trabalho, entretanto, não nos permitem chegar a uma conclusão sobre os mecanismos moleculares pelos quais o extrato de *Melissa officinalis* interfere com as respostas comportamentais ligadas à ansiedade e as cognitivas, mas eles apontam para a necessidade de pesquisas futuras para investigar novos fitoterápicos que auxiliem na farmacoterapia de muitas patologias relacionadas ao SNC e incentivar, quem sabe, suas patentes.

Com o avanço da ciência que vem sendo observado nos últimos anos, espera-se que esses mistérios relacionados à fisiopatologia da sepse acompanhada de suas várias interferências sejam mais bem compreendidos. No caso da interferência da ativação colinérgica como uma possível alternativa para estudar mecanismos de ação de novas terapêuticas, essa descoberta, ora apresentada, pode abrir um leque de possibilidades para explorar novos avanços nesta área. Isto pode focar no fato de que a ativação colinérgica central pode afetar a neurogênese e função hipocampal, favorecendo os déficits cognitivos, que poderão estar associados às várias alterações comportamentais.

Para que isso ocorra, há necessidade de que a genética, patologia, biologia molecular, entre outras ciências, possam se integrar de uma forma a chegar a um

alvo que entenda como ocorre essa correlação entre os efeitos da nicotina ou do extrato de *Melissa officinalis*, por exemplo, com os mediadores da inflamação e o comprometimento na proliferação microbiana. Essas descobertas poderão favorecer um diagnóstico mais precoce, rastreamento microbiano mais eficaz que otimize as variáveis hemodinâmicas e as técnicas de suporte orgânico.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Akhondzadeh S, Noroozian M, Mohammadi M, Ohadinia S, Jamshidi AH, Khani M. Melissa officinalis extract in the treatment of patients with mild to moderate Alzheimer's disease: a double blind, randomised, placebo controlled trial. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 74: 863-866, 2003.

American Psychiatry Association. Manual diagnóstico e estatístico de transtornos mentais - DSM-IV-TR. (C. Dornelles, Trad.). (4ª ed.). Porto Alegre: Artmed, 2002.

Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker 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.

Antonopoulou A, Giamarellos-Bourboulis EJ. Immunomodulation in sepsis: state of the art and future perspective. *Immunotherapy*, 3: 117-128, 2011.

Apisarnthanarak A, Mundy LM. Inappropriate use of carbapenems in Thailand: a need for better education on de-escalation therapy. *Clin Infect Dis*, 47: 858-9, 2008.

Awad R, Muhammad A, Durst T, Trudeau VL, Arnason JT. Bioassay-guided fractionation of lemon balm (*Melissa officinalis* L.) using an in vitro measure of GABA transaminase activity. *Phytother Res*, 23: 1075-1081, 2009.

Azizbeigi R, Ahmadi S, Babapour V, Rezayof A, Zarrindast MR. Nicotine restores morphine-induced memory deficit through the D1 and D2 dopamine receptor mechanisms in the nucleus accumbens. *J Psychopharmacol*, 25: 1126-1133, 2011.

Barichello T, Martins MR, Reinke A, Constantino LS, Machado RA, Valvassori SS, Moreira JCF, Quevedo J, Dal-Pizzol F. Behavioral deficits in sepsis-surviving rats induced by cecal ligation and perforation. *Braz J Med Biol Res*, 40: 831-837, 2007.

Barichello T, Martins MR, Reinke A, Feier G, Ritter C, Quevedo J, Dal-Pizzol F. Cognitive impairment in sepsis survivors from cecal ligation and perforation. *Crit Care*

Med, 33: 221-223, 2005.

Barichello T, Milioli G, Generoso JS, Cipriano AL, Costa CS, Moreira AP, Vilela MC, Comim CM, Teixeira AL, Quevedo J. Imipramine reverses depressive-like parameters in pneumococcal meningitis survivor rats. *J Neural Transm*, 2011.

Bauer ME. Estresse: como ele abala as defesas do corpo? *Ciência Hoje*, 30: 20-25, 2002.

Bauzo RM, Bruijnzeel AW. Animal models of nicotine withdrawal: intracranial self-stimulation and somatic signs of withdrawal. *Methods Mol Biol*, 829: 257-268, 2012.

Benowitz NL. Nicotine addiction. *N Engl J Med*, 362: 2295-2303, 2010.

Berg ME. Plantas medicinais na Amazônia: Contribuição ao seu conhecimento sistemático. 2 ed. rev. e. aum. Belém: MPEG, 207 p. Il, 1993.

Berlin C. Herbal medicine. *Clin Pediatr (Phila)*, 40: 271–272, 2001.

Bhatty M, Pruett SB, Swiatlo E, Nanduri B. Alcohol abuse and *Streptococcus pneumoniae* infections: consideration of virulence factors and impaired immune responses. *Alcohol*, 45: 523-539, 2011.

Bohnen JM, Solomkin JS, Dellinger EP, Bjornson HS, Page CP. Guidelines for clinical care: anti-infective agents for intra-abdominal infection. A Surgical Infection Society policy statement. *Arch Surg*, 127: 83-89, 1992.

Bolkent S, Yanardag R, Karabulut-Bulan O, Yesilyaprak B. Protective role of *Melissa officinalis* L. extract on liver of hyperlipidemic rats: A morphological and biochemical study. *J Ethnopharmacol*, 99: 391-398, 2005.

Borovikova, LV, Ivanova S, Zhang M, Yang H, Botchkina GI, Watkins LR, Wang H, Abumrad N, Eaton JW, Tracey KJ. Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. *Nature*, 405: 458-462, 2000.

Borrás MRL. Plantas da Amazônia: medicinais ou mágicas? Ed. Valer, 2003.

Cai B, Deitch EA, Ulloa L. Novel insights for systemic inflammation in sepsis and hemorrhage. *Mediators Inflamm*, 642462, 2010.

Camargo FAC, Rigato O. Principles of Antibiotic Therapy in Sepsis. *Rev Bras Ter Int*, 16: 2004.

Carobrez AP, Bertoglio LJ. Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: the elevated plus-maze model 20 years on. *Neurosci Biobehav Rev*, 29: 1193-1205, 2005.

Cassol-Jr OJ, Comim CM, Silva BR, Hermani FV, Constantino LS, Felisberto F, Petronilho F, Hallak JE, De Martinis BS, Zuardi AW, Crippa JA, Quevedo J, Dal-Pizzol F. Treatment with cannabidiol reverses oxidative stress parameters, cognitive impairment and mortality in rats submitted to sepsis by cecal ligation and puncture. *Brain Res.*, 1348: 128-138, 2010.

Castro AA, Ghisoni K, Latini A, Quevedo J, Tasca CI, Prediger RD. Lithium and valproate prevent olfactory discrimination and short-term memory impairments in the intranasal 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) rat model of Parkinson's disease. *Behav Brain Res*, 2012. [Epub ahead of print]

Coleta M, Campos MG, Cotrim MD, Proença da Cunha A. Comparative evaluation of *Melissa officinalis* L., *Tilia europaea* L., *Passiflora edulis* Sims. and *Hypericum perforatum* L. in the elevated plus maze anxiety test. *Pharmacopsychiatry*, 34: S20-21, 2001.

Comim CM, Constantino LS, Petronilho F, Quevedo J, Dal-Pizzol F. Aversive memory in sepsis survivor rats. *J Neural Transm*, 118: 213-217, 2011.

Cruz AP, Frei F, Graeff FG. Ethopharmacological analysis of rat behavior on the elevated plus-maze. *Pharmacol Biochem Behav*, 49: 171-176, 1994.

Dagyt G, Den Boer JA, Trentani A. The cholinergic system and depression. *Behav Brain Res.*, 221: 574-582, 2011.

Dani JA, De Biasi M. Cellular mechanisms of nicotine addiction. *Pharmacol Biochem Behav*, 70: 439-446, 2001.

Das UN. Relationship between gut and sepsis: Role of ghrelin. *World J Diabetes*, 2: 1-7, 2011.

De Biasi M, Dani JA. Reward, addiction, withdrawal to nicotine. *Annu Rev Neurosci*, 34:105-130, 2011.

Demain AL. Antibiotics: natural products essential to human health. *Med Res Rev*, 29: 821-842, 2009.

Dos Santos JG Jr, Blanco MM, Do Monte FH, Russi M, Lanziotti VM, Leal LK, Cunha GM. Sedative and anticonvulsant effects of hydroalcoholic extract of *Equisetum arvense*. *Fitoterapia*, 76: 508-513, 2005.

Dressing H, Riemann D, Low H, Schredl M, Reh C, Laux P, Muller W. Insomnia: are valerian/balm combinations of equal value of benzodiazepine. *Therapiewoche*, 42: 726-736, 1992.

Drozd J, Anuszevska E. The effect of the *Melissa officinalis* extract on immune response in mice. *Acta Pol Pharm*, 60: 467-470, 2003.

Eachempati SR, Hydo LJ, Shou J, Barie PS. Does de-escalation of antibiotic therapy for ventilator-associated pneumonia affect the likelihood of recurrent pneumonia or mortality in critically ill surgical patients? *J Trauma*, 66: 1343-1348, 2009.

Ebbert JO, Fagerstrom K. Pharmacological interventions for the treatment of smokeless tobacco use. *CNS Drugs*, 26: 1-10, 2012.

File SE, Cheeta S, Kenny PJ. Neurobiological mechanisms by which nicotine mediates different types of anxiety. *Eur J Pharmacol*, 393: 231-236, 2000.

Fisch GS. Animal models and human neuropsychiatric disorders. *Behav Genet*, 37: 1–10, 2007

Freire CM, Marques MO, Costa M. Effects of seasonal variation on the central nervous system activity of *Ocimum gratissimum* L. essential oil. *J Ethnopharmacol*, 105: 161-166, 2006.

Friedman G, Silva E, Vincent JL- Has the mortality of septic shock changed with time? *Crit. Care Med.*, 26: 2078-2086, 1998.

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. *Ethnopharmacology*, 109: 338-347, 2007.

Goodwin RD, Lavoie KL, Lemeshow AR, Jenkins E, Brown ES, Fedoronko DA. Depression, Anxiety, and COPD: The Unexamined Role of Nicotine Dependence. *Nicotine Tob Res*, 14: 176-183, 2012.

Granja C, Dias C, Costa-Pereira A, Sarmiento A. Quality of life of survivors from severe sepsis and septic shock may be similar to that of others who survive critical illness. *Crit Care*, 8: R91–R98, 2004.

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

Hanna N. Sepsis and septic shock. *Top Emerg Med*, 25: 158-165, 2003.

Hays JT, McFadden DD, Ebbert JO. Pharmacologic agents for tobacco dependence treatment: 2011 update. *Curr Atheroscler Rep*, 14: 85-92, 2012.

Hopkins RO, Brett S. Chronic neurocognitive effects of critical illness. *Curr Opin Crit Care*, 11: 369-375, 2005.

Howes MJ, Perry E. The role of phytochemicals in the treatment and prevention of dementia. *Drugs Aging*, 28: 439-468, 2011.

Hurley LL, Taylor RE, Tizabi Y. Positive and negative effects of alcohol and nicotine and their interactions: a mechanistic review. *Neurotox Res*, 21: 57-69, 2012.

Irvine EE, Cheeta S, Marshall M, File SE. Different treatment regimens and the development of tolerance to nicotine's anxiogenic effects. *Pharmacol Biochem Behav*, 68: 769-776, 2001.

Iványi B, Beres BJ, Szabo D. Recent advances in sepsis research: novel biomarkers and therapeutic targets. *Curr Med Chem*, 18: 3211-3225, 2011.

Ivanov, AI, Kulchitsky VA, Sugimoto N, Simons CT, Romanovsky A A. Does the formation of lipopolysaccharide tolerance require intact vagal innervation of the liver? *Auton Neurosci*, 85: 111-118, 2000.

Jager AK, Gauguin B, Adersen A, Gudiksen L. Screening of plants used in Danish folk medicine to treat epilepsy and convulsions. *J Ethnopharmacol*, 105: 294-300, 2006.

Karima R, Matsumoto S, Higashi H, Matsushima K. The molecular pathogenesis of endotoxic shock and organ failure. *Mol Med Today*, 5: 123-132, 1999.

Kelsey NA, Wilkins HM, Linseman DA. Nutraceutical antioxidants as novel neuroprotective agents. *Molecules*, 15: 7792-7814, 2010.

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

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

Kennedy DO, Wake G, Savelev S, Tildesley NT, Perry EK, Wesnes KA, Scholey AB. Modulation of mood and cognitive performance following acute administration of single doses of *Melissa officinalis* (Lemon balm) with human CNS nicotinic and muscarinic receptor-binding properties. *Neuropsychopharmacology*, 28: 1871-1881, 2003.

Kimura F, Shimizu H, Yoshidome H, Ohtsuka M, Miyazaki M. Immunosuppression following surgical and traumatic injury. *Surg. Today*, 40: 793-808, 2010.

Kumar A, Roberts D, Wood KE, Light B, Parrillo JE, Sharma S, et al. Duration of hypotension before initiation of effective antimicrobial therapy is the critical determinant of survival in human septic shock. *Crit Care Med*, 34: 1589-96, 2006.

Lader M. Benzodiazepines revisited--will we ever learn? *Addiction*, 106: 2086-109, 2011.

Levin ED, Rezvani AH. Development of nicotinic drug therapy for cognitive disorders. *Eur J Pharmacol*, 393: 141-146, 2000.

Levin ED. Development of treatments for toxicant-induced cognitive deficits. *Neurotoxicol Teratol*, 15: 203-206, 1993.

Lorenzi H, Mato FJA *Plantas medicinais no Brasil: nativas ou exóticas*. São Paulo: Instituto Plantarum de Estudos da Flora LTDA, 512p., 2002.

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.

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.

Marks MJ, Stitzel JA, Collins AC. Time course study of the effects of chronic nicotine

infusion on drug response and brain receptors. *J Pharmacol Exp Therap*, 235: 619-628, 1985.

Matsunaga K, Klein TW, Friedman H, Yamamoto Y. Involvement of nicotinic acetylcholine receptors in suppression of antimicrobial activity and cytokine responses of alveolar macrophages to *Legionella pneumophila* infection by nicotine. *J Immunol*, 167: 6518-24, 2001.

Mazuski JE - The Surgical Infection Society Guidelines on Antimicrobial Therapy for Intra-Abdominal Infections: Evidence for the Recommendations. *Surg Infect*, 3: 175-233, 2002.

McKenzie C. Antibiotic dosing in critical illness. *J Antimicrob Chemother*, 66 Suppl 2: ii25-31, 2011.

Mehta M, Adem A, Kahlon MS, Sabbagh MN. The nicotinic acetylcholine receptor: smoking and alzheimer's disease revisited. *Front Biosci (Elite Ed)*. 4: 169-180, 2012.

Michelson D, Gold PW, Sternberg EM. The stress in critical illness. *New Horiz*, 2: 426-431, 1994.

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

Möhler H. The rise of a new GABA pharmacology. *Neuropharmacology*, 60: 1042-1049, 2011.

Montgomery KC. The relation between fear induced by novel stimulation and exploratory behaviour. *J Comp Physiol Psychol*, 48: 254-260, 1955.

Musthaba M, Baboota S, Athar TM, Thajudeen KY, Ahmed S, Ali J. Patented herbal formulations and their therapeutic applications. *Recent Pat Drug Deliv Formul*, 4: 231-244, 2010.

Nestler EJ. Is there a common molecular pathway for addiction? *Nat Neurosci*, 8: 1445-1449, 2005.

Newman DJ, Cragg GM, Snader KM. The influence of natural products upon drug discovery. *Nat Prod Rep*, 17: 215–34, 2000.

Nutt D, Demyttenaere K, Janka Z, Aarre T, Bourin M, Canonico PL, Carrasco JL, Stahl S. The other face of depression, reduced positive affect: the role of catecholamines in causation and cure. *J Psychopharmacol.*, 21: 461-471, 2007.

Organização Mundial da Saúde - OMS (2001). *Confronting the tobacco epidemic in an era of trade liberalization*. Geneva: WHO.

Oztürk N, Ba er KH, Aydin S, Oztürk Y, Cali I. Effects of *Gentiana lutea* ssp. *symphyandra* on the central nervous system in mice. *Phytother Res*, 16: 627-631, 2002.

Pavlov VA, Ochani M, Yang LH, Gallowitsch-Puerta M, Ochani K, Lin X, Levi J, Parrish WR, Rosas-Ballina M, Czura CJ, Larosa GJ, Miller EJ, Tracey KJ, Al-Abed Y. Selective alpha7-nicotinic acetylcholine receptor agonist GTS-21 improves survival in murine endotoxemia and severe sepsis. *Crit Care Med*, 35: 1139-1144, 2007.

Pehrson AL, Philibin SD, Gross D, Robinson SE, Vann RE, Rosecrans JA, James J R. The effects of acute and repeated nicotine doses on spontaneous activity in male and female Sprague Dawley rats: analysis of brain area epibatidine binding and cotinine levels. *Pharmacol Biochem Behav*, 89: 424- 431, 2008.

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 Meth*, 14: 149-167, 1985.

Pereira P, Tysca D, Oliveira P, Brum LFS, Picada JN, Ardenghi. Neurobehavioral and genotoxic aspects of rosmarinic acid. *Pharmacological*, 52:199-203, 2005.

Perry E, Howes MJ. Medicinal plants and dementia therapy: herbal hopes for brain aging? *CNS Neurosci Ther*, 17: 683-698, 2011.

Petersen M, Simmonds MSJ. Rosmarinic acid. *Phytochemistry*, 62:121-25, 2003.

Pinn G. Herbal medicine in infectious disease. *Aust Fam Physician*, 30: 681-684, 2001.

Piri M, Zarrindast MR. Nitric oxide in the ventral tegmental area is involved in retrieval of inhibitory avoidance memory by nicotine. *Neuroscience*. 175: 154-161, 2011.

Prus AJ, Vann RE, Rosecrans JA, James JR, Pehrson AL, O'Connell MM, Philibin SD, Robinson SE. Acute nicotine reduces and repeated nicotine increases spontaneous activity in male and female Lewis rats. *Pharmacol Biochem Behav*, 91: 150-154, 2008.

Rahmanian S, Wewers ME, Koletar S, Reynolds N, Ferketich A, Diaz P. Cigarette smoking in the HIV-infected population. *Proc Am Thorac Soc*, 8: 313-319, 2011.

Rehman J, Dillow JM, Carter SM, Chou J, Le B, Maisel AS. Increased production of antigen-specific immunoglobulins G and M following in vivo treatment with the medicinal plants *Echinacea angustifolia* and *Hydrastis canadensis*. *Immunol Lett*, 68: 391–395, 1999.

Revilla J. Plantas medicinais da Amazônia: oportunidades econômicas e sustentáveis. 2ª ed. INPA e SEBRAE, 2001.

Robinson SE, Vann RE, Britton AF, O'Connell MM, James JR, Rosecrans JA. Cellular nicotinic receptor desensitization correlates with nicotine-induced acute behavioral tolerance in rats. *Psychopharmacology*, 192: 71- 78, 2007.

Rodrigues E. Plants and animals utilized as medicines in the Jaú National Park (JNP), Brazilian Amazon. *Phytother Res*, 20: 378-391, 2006.

Roiser JP, Elliott R, Sahakian BJ. Cognitive mechanisms of treatment in depression. *Neuropsychopharmacology*. 37: 117-136, 2012.

Rosecrans JA. The psychopharmacological basis of nicotine's differential effects on behavior: individual subject variability in the rat. *Behav Genet*, 25: 187-196, 1995.

Rothenhausler HB, Ehrentraut S, Stoll C, Schelling G, Kapfhammer HP. The relationship between cognitive performance and employment and health status in long-term survivors of the acute respiratory distress syndrome: results of an exploratory study. *Gen Hosp Psychiatry*, 23: 90–96, 2001.

Russell JA, Boyd J, Nakada T, Thair S, Walley KR. Molecular mechanisms of sepsis. *Contrib Microbiol*, 17: 48-85, 2011.

Salah SM, Jager AK. Screening of traditionally used Lebanese herbs for neurological activities. *J Ethnopharmacol*, 97: 145–149, 2005.

Salas R, Orr-Urtreger A, Broide RS, Beaudet A, Paylor R, De Biasi M. The nicotinic acetylcholine receptor subunit alpha 5 mediates short-term effects of nicotine in vivo. *Mol Pharmacol*, 63: 1059-1066, 2003.

Sales Júnior JA1, David CM2, Hatum R, Souza PC, Japiassú A, Pinheiro CT, Friedman G, Silva OB, Dias MD, Koterba E, Dias FS, Cláudio Piras C, Grupo de Estudo de Sepse do Fundo AMIB, Luiz RR. Sepsis Brasil: Estudo Epidemiológico da Sepsis em Unidades de Terapia Intensiva Brasileiras. *Rev. Bras. Ter. Intensiva*, 18: 9-17, 2006.

Salomão R, Diament D, Rigatto O, Gomes B, Silva E, Carvalho NB, Machado FR. Diretrizes para tratamento da sepse grave/choque séptico: abordagem do agente infeccioso - controle do foco infeccioso e tratamento antimicrobiano. *Rev Bras Ter Int*, 23: 2011.

Scaglione F. Pharmacokinetic/pharmacodynamic (PK/PD) considerations in the management of Gram-positive bacteraemia. *Int J Antimicrob Agents*. 36 Suppl 2: S33-39, 2010.

Schmieder R, Edwards R. Insights into antibiotic resistance through metagenomic approaches. *Future Microbiol*, 7: 73-89, 2012.

Silva SM, Ferreira VM, Feres O, Oliveira PG, Sousa JB. Does metoclopramide impair anastomotic healing of the left colon of rats? *Acta Cir Bras*, 26: 297-302, 2011.

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.

Sousa AC, Aliviano DS, Blank AF, Alves PB, Aliviano CS, Gattass CR. *Melissa officinalis* L. essential oil: antitumoral and antioxidant activities. *J Pharm Pharmacol*, 56: 677-681, 2004.

Spencer JP, Vafeiadou K, Williams RJ, Vauzour D. Neuroinflammation: Modulation by flavonoids and mechanisms of action. *Mol Aspects Med*, 33: 83-97, 2012.

Steiner AA, Oliveira DL, Roberts JL, Petersen SR, Romanovsky AA. Nicotine administration and withdrawal affect survival in systemic inflammation models. *J Appl Physiol*, 105: 1028-1034, 2008.

Szatmari S, Vegh T, Csomos A, Hallay J, Takacs I, Molnar C, Fulesdi B. (2010) Impaired cerebrovascular reactivity in sepsis-associated encephalopathy studied by acetazolamide test. *Crit Care*, 14, R50, 2010.

Taylor L, Loerbroks A, Herr RM, Lane RD, Fischer JE, Thayer JF. Depression and smoking: mediating role of vagal tone and inflammation. *Ann Behav Med*, 42: 334-340, 2011.

Teske M, Trentini AMM. *Herbarium*, 2nd. Ed. Curitiba: Laboratório Botânico, p.410, 1994.

Textoris J, Wiramus S, Martin C, Leone M. Antibiotic therapy in patients with septic shock. *Eur J Anaesthesiol*, 28: 318-324, 2011.

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

Tsoyi K, Jang HJ, Kim JW, Chang HK, Lee YS, Pae HO, Kim HJ, Seo HG, Lee JH, Chung HT, Chang KC. Stimulation of alpha7 nicotinic acetylcholine receptor by nicotine attenuates inflammatory response in macrophages and improves survival in experimental model of sepsis through heme oxygenase-1 induction. *Antioxid Redox Signal*, 14: 2057-2070, 2011.

Tuon L, Comim CM, Petronilho F, Barichello T, Izquierdo I, Quevedo J, Dal-Pizzol F. Time-dependent behavioral recovery after sepsis in rats. *Intensive Care Med*, 34: 1724-1731, 2008a.

Tuon L, Comim CM, Petronilho F, Barichello T, Izquierdo I, Quevedo J, Dal-Pizzol, F. Memory-enhancing treatments reverse the impairment of inhibitory avoidance retention in sepsis-surviving rats. *Crit Care*, 12, R133, 2008b.

Van der Poll T, Van Zoelen MA, Wiersinga WJ. Regulation of pro-and anti-inflammatory host responses. *Contrib Microbiol*, 17:125-136, 2011.

Van der Staay FJ, Arndt SS, Nordquist RE. Evaluation of animal models of neurobehavioral disorders. *Behav Brain Funct.*, 5:11, 2009.

Van Westerloo DJ, Giebelen IA, Florquin S, Daalhuisen J, Bruno MJ, de Vos AF, Tracey KJ, van der Poll T. The cholinergic anti-inflammatory pathway regulates the host response during septic peritonitis. *J Infect Dis*, 191: 2138-48, 2005.

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 H, Liao H, Ochani M, Justiniani M, Lin Yang L, Al-Abed Y, Metz C, Miller EJ, Tracey KJ, Ulloa L. Cholinergic agonists inhibit HMGB1 release and improve survival in experimental sepsis. *Nat Med*, 10: 1216-21, 2004.

Wiersinga WJ. Current insights in sepsis: from pathogenesis to new treatment targets. *Curr Opin Crit. Care*, 17: 480-486, 2011.

Wilson MR, Roos KL. Infectious diseases and impaired consciousness. *Neurol Clin*, 29: 927-942, 2011.

Wong AHC, Smith M, Boon HS. Herbal remedies in psychiatric practice. *Arch. Gen. Psychiatry*, 55: 1033-1044, 1998.

Wonnacott S. The paradox of nicotinic acetylcholine receptor upregulation by nicotine. *Trends Pharmacol Sci*, 11: 216-219, 1990.

Yunes RA, Calixto JB. *Plantas Medicinais sob a Ótica da Química Medicinal Moderna*. SC: ARGOS editora universitária, 523p., 2001.

ANEXO: comprovante do Comitê de Ética no Uso Animal (CEUA)