



Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia  
Rede Nordeste de Biotecnologia  
Universidade Federal do Piauí – UFPI

**Efeitos farmacológicos do monoterpene (-) - Borneol em modelos animais  
visando o planejamento de um novo fármaco no tratamento da ansiedade e  
adicação**

Maurício Pires de Moura do Amaral

Teresina – PI

2017

Maurício Pires de Moura do Amaral

**Efeitos farmacológicos do monoterpene (-) - Borneol em modelos animais visando o planejamento de um novo fármaco no tratamento da ansiedade e adicção**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia, Ponto Focal Piauí (RENORBIO/UFPI), como requisito de defesa para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia de Recursos Naturais.

Orientadora: Profa. Dra. **Rita de Cássia Meneses Oliveira**

Teresina – PI

2017

Maurício Pires de Moura do Amaral

**Efeitos farmacológicos do monoterpene (-) - Borneol em modelos animais visando o planejamento de um novo fármaco no tratamento da ansiedade e adicção**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia, Ponto Focal Piauí (RENORBIO/UFPI), como requisito de defesa para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia de Recursos Naturais.

Aprovada em \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA**

\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Rita de Cássia Meneses Oliveira (Presidente)  
Departamento de Biofísica e fisiologia – CCS/UFPI

\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Francisco das Chagas Alves Lima (1º Examinador)  
Departamento de Química – CCN/UESPI

\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Maria Jose dos Santos Soares (2º Examinador)  
Departamento de Medicina Veterinária – CCA/UFPI

\_\_\_\_\_  
Dra. Ana Paula dos Santos Correia Lima da Silva (1º Examinador externo)  
Coordenação do Curso de Farmácia-CCS/UFPI

\_\_\_\_\_  
Prof. Dr Luciano da Silva Lopes (2º Examinador externo)  
Departamento de Biofísica e Fisiologia – CCS/UFPI

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ**

**REITOR**

Prof. Dr. José Arimatéia Dantas Lopes

**VICE-REITOR**

Profa. Dra. Nadir do Nascimento Nogueira

**PRÓ -REITOR DE ENSINO DE PÓS-GRADUAÇÃO - PRPG**

Prof. Dr. Helder Nunes Cunha

**DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE-CCS**

Prof. Dr. Viriato Campelo

**COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
BIOTECNOLOGIA DA REDE NORDESTE DE BIOTECNOLOGIA –  
RENORBIO/PIAUÍ**

Profa. Dra. Carla Eiras

## ***DEDICATÓRIA***

---

*Dedico essa etapa a **DEUS** e aos meus pais, **José Osmar do Amaral e Sofia Amélia Pires de Moura do Amaral**. O amor deles nunca faltou, assim como paciência, compreensão e sabedoria.*

## **AGRADECIMENTOS**

---

Agradeço, primeiramente, ao meu **Deus**, meu Senhor e meu amigo. Estar contigo em todos os momentos e neles buscar, um pouco de sua sabedoria, orientação e paciência é uma meta de vida. Sem o Senhor sou cinzas.

Aos meus pais *José Osmar do Amaral e Sofia Amélia Pires de Moura do Amaral*. Não sou poeta e ando longe de conseguir expressar em palavras meus mais profundos sentimentos. Se poeta fosse já teria, em papel e tinta, arrancado do fundo do meu coração a felicidade de ser filho de um homem e de uma mulher que dedicaram a vida, de forma incondicional, aos filhos superando muitas dificuldades e colocando o ego sempre a margem de seus projetos pessoais.

Agradeço aos meus irmãos *José Osmar do Amaral Júnior, Daniela Pires de Moura do Amaral e Fabrício Pires de Moura do Amaral*. Agora, nesses tempos em que a maturidade bate a porta, a capilaridade do amor fraterno é maior e mais intensa do que nunca.

Agradeço, imensamente, à minha orientadora, *Profa. Dra. Rita de Cássia Meneses Oliveira*, que de forma serena disse sim ao meu pedido de orientação, disse sim ao meu pedido de mudança de linha e disse não quando deveria dizer e quando eu deveria escutar. Sua inteligência emocional e sua forma em lidar com adversidades fazem de você uma pessoa única. Parabéns pelo ser humano que você é. Agradeço a Deus por ter lhe conhecido.

Ao *Prof Dr. Hélio de Barros Fernandes*, você foi um amigo inesperado em um momento inesperado e não tenho palavras para lhe agradecer. Ao *Prof. Dr. Daniel Dias Rufino Arcanjo* cujo potencial já extrapola os muros da UFPI. Obrigado pelo apoio e ideias. Aos amigos *Prof. Dr. Anderson Nogueira Mendes e Prof. Dr. Juan Carlos Ramos Gonçalves* que nestes últimos dois anos estiveram presentes em minha vida profissional e pessoal. Trabalhar com amigos que possuem a mesma noção de valores e aspirações é sempre uma motivação para continuar.

Agradeço a **Universidade Federal do Piauí (UFPI)** em nome da **coordenação local do programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia** (ponto focal Renorbio-PI), ao Curso de Farmácia/UFPI e à todos do departamento do qual, com muito orgulho, faço parte.

Agradeço ao *Prof. Dr. Francisco das Chagas Alves Lima*, do departamento de Química da Universidade Estadual do Piauí (CCN/UESPI), pelo auxílio nos programas de docagem molecular utilizados nesse trabalho e por aceitar participar da banca de qualificação e de defesa.

Agradeço à *Profa. Dra. Maria Jose dos Santos Soares* e à *Dra. Ana Paula dos Santos Correia Lima da Silva* por terem aceito o convite em participar da banca de defesa. Suas orientações e sugestões são muito bem-vindas.

Bom...não posso esquecer de vocês, *Prof. Dr. Luciano da Silva Lopes*, *Profa. Dra. Francilene Vieira Silva*, *Profa. MSc Celyane Alves Piaulino*, obrigado, realmente, por tudo.

*“Não tenha medo de crescer lentamente. Tenha medo, apenas, de ficar parado ”.*

**Provérbio Chinês**

**Efeitos farmacológicos do monoterpene (-) - Borneol em modelos animais visando o planejamento de um novo fármaco no tratamento da ansiedade e adicção.** MAURÍCIO PIRES DE MOURA DO AMARAL. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia – RENORBIO. Ponto Focal UFPI. Tese de Doutorado. Orientadora: Profa. Dra. Rita de Cássia Meneses Oliveira.

## RESUMO

O Borneol é um monoterpene bicíclico que pode ser obtido como mistura racêmica [(+)-Borneol + (-) - Borneol] a partir de óleos essenciais de plantas medicinais como a *Valeriana officinalis* L. (Erva de gato), *Matricaria chamomilla* L. (Camomila), *Lavandula officinalis* Chaix & Kitt (Alfazema) ou como molécula sintética de grande aplicação na indústria alimentícia, cosmética e farmacêutica. Estudos farmacológicos do Borneol indicam atividade cardiovascular, aumento da permeabilidade da barreira hematoencefálica, antinocicepção e neuroproteção. Este trabalho teve o objetivo de investigar o efeito ansiolítico e antiadictivo do (-) - Borneol [(-) – BOR] sintético com o intuito de contribuir com maiores informações farmacológicas e toxicológicas sobre este monoterpene, visando um embasamento maior da molécula como uma alternativa terapêutica no tratamento da ansiedade e da adicção. Os resultados obtidos através desse estudo foram apresentados em 3 (três) capítulos. No primeiro capítulo investigou-se o possível efeito sedativo e ansiolítico do (-) - BOR em camundongos. O (-) - BOR apresentou efeito ansiolítico ao reduzir o tempo de início e prolongar o tempo total de sono induzido por tiopental sódico. Além disso, o (-) - BOR também apresentou efeito ansiolítico ao reduzir a atividade locomotora dos animais no teste do campo aberto e ao aumentar o tempo de permanência dos animais na área clara e nos braços abertos nos testes da caixa claro-escuro e labirinto em cruz elevado, respectivamente. Como embasamento teórico, realizou-se um estudo de docagem molecular entre o (-) - BOR e o receptor GABA<sub>A</sub> (GABA<sub>A</sub>R). Assim, no estudo de docagem, foi possível perceber que existe interação molecular entre o monoterpene e o GABA<sub>A</sub>R sendo este, portanto, um possível mecanismo de ação ansiolítica. No segundo capítulo investigou-se a atividade do (-) - BOR em camundongos dependentes e abstinentes a morfina. No estudo, foi possível observar que o (-) - BOR interfere no desenvolvimento de preferência condicionada por lugar (PCL) por morfina ao reduzir o tempo de permanência dos animais no ambiente pareado e na abstinência, ao reduzir o comportamento de saltar. A avaliação do efeito genotóxico do (-) - BOR foi realizada em sangue periférico dos camundongos através do teste do cometa. Em nenhum dos parâmetros observados o (-) - BOR apresentou efeito genotóxico. No terceiro capítulo, investigou-se o efeito neuroprotetor do (-) - BOR na fragmentação de DNA induzida por morfina em áreas mesolímbicas como o hipocampo e córtex pré-frontal de camundongos. O (-) - BOR reduz o dano ao DNA induzido por morfina nas duas áreas mesolímbicas avaliadas, o que provavelmente protegeria essas áreas em pacientes que utilizam morfina de forma crônica. A avaliação do (-) - BOR sobre a atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH) demonstra que os efeitos do monoterpene não podem ser relacionados com atividade antinecrótica, pois tanto o (-) - BOR quanto a morfina não interferem na atividade da enzima. Assim, investigação do (-) - BOR revelou que a molécula possui propriedades ansiolíticas, antiadictivas e neuroprotetora observadas em modelos animais com camundongos *Swiss webster*.

**Palavras-chave:** Abstinência. Adicção. (-) – Borneol. Docagem molecular. GABA<sub>A</sub>Rs. Neuroproteção. Teste do Cometa.

**Pharmacological effects of monoterpene (-) - Borneol in animal models for the planning of a new drug in the treatment of anxiety and addiction.** MAURÍCIO PIRES DE MOURA DEL AMARAL. Postgraduate Program in Biotechnology of the Northeast Network of Biotechnology- RENORBIO. Focal Point UFPI. Doctoral thesis. Advisor: Profa. Dra. Rita de Cássia Meneses Oliveira.

### ABSTRACT

Borneol is a bicyclic monoterpene which can be obtained as a racemic mixture [(+) - Borneol + (-) - Borneol] from essential oils of medicinal plants such as *Valeriana officinalis* L. (Cat's grass), *Matricaria chamomilla* L. (Chamomile), *Lavandula officinalis* Chaix & Kitt (Lavender) or as synthetic molecule of great application in the food, cosmetic and pharmaceutical industry. Pharmacological studies of Borneol point to cardiovascular activity, increased permeability of the blood-brain barrier, antinociception and neuroprotection. This work aimed to investigate the anxiolytic and antiaddictive effect of synthetic (-) - Borneol [(-) - BOR] in order to contribute with greater pharmacological and toxicological information about this monoterpene, aiming a greater base of the molecule as therapeutic alternative in treatment of anxiety and Addiction. The results obtained through this study were presented in 3 (three) chapters. In the first chapter, we investigated the possible sedative and anxiolytic effect of (-) - BOR in mice. (-) - BOR presented anxiolytic effect by reducing the onset time and prolonging the total sleep time induced by thiopental sodium. In addition, (-) - BOR also presented an anxiolytic effect by reducing the locomotor activity of the animals in the open field test and increasing the spent time of the animals both in the light area and in the open arms in the tests of the light-dark box and elevated plus maze, respectively. As a theoretical basis, a molecular docking study was performed between the (-) - BOR and the GABA<sub>A</sub> receptor (GABA<sub>A</sub>R). Thus, in the docking study, it was possible to observed that there is a molecular interaction between monoterpene and GABA<sub>A</sub>R, which is, therefore, a possible mechanism of anxiolytic action. In the second chapter the activity of (-) - BOR was investigated in morphine-dependent and abstinent mice. In the study, it was possible to observe that (-) - BOR interferes in the development of place-based preference (PCP) for morphine by reducing the spent time of the animals in the paired environment and in abstinence by reducing jumping behavior. The evaluation of the genotoxic effect of (-) - BOR was performed in peripheral blood of the mice through the comet assay. In none of the parameters observed did (-) - BOR show genotoxic effect. In the third chapter, we investigated the neuroprotective effect of (-) - BOR on morphine-induced DNA fragmentation in mesolimbic areas such as the hippocampus and prefrontal cortex of mice. (-) - BOR reduces morphine-induced DNA damage in the two mesolimbic areas evaluated, which would probably protect these areas in patients using chronic morphine. The evaluation of (-) - BOR on the activity of the enzyme lactate dehydrogenase (LDH) demonstrates that the effects of monoterpene can not be related to antinecrotic activity, since both (-) - BOR and morphine do not interfere in enzyme activity. Thus, investigation of (-) - BOR revealed that the molecule has anxiolytic, anti-addictive and neuroprotective properties observed in animal models with *Swiss webster* mice.

**Keywords:** Abstinence. Addiction. (-) - Borneol. Comet assay. GABA<sub>A</sub>Rs. Molecular docking. Neuroprotection.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Introdução</b>		
<b>Figura 1</b>	Ciclo de autoadministração de substância adicta (ex. álcool, tabaco, opioides e benzodiazepínicos).....	17
<b>Revisão de literatura</b>		
<b>Figura 1</b>	Exemplo de aparato para o teste do labirinto em cruz elevado..	26
<b>Figura 2</b>	Exemplo de aparato utilizado no teste da caixa claro-escuro.....	27
<b>Figura 3</b>	Exemplo de aparato utilizado no teste do campo aberto.....	28
<b>Figura 4</b>	Sistema mesocorticolímbico ou sistema recompensa.....	31
<b>Figura 5</b>	Mecanismos dos alcaloides cocaína e morfina sobre a transmissão dopaminérgica no sistema recompensa.....	33
<b>Figura 6</b>	Exemplo do modelo Preferência Condicionada por Lugar (PCL).....	35
<b>Figura 7</b>	Câmara operante para autoadministração de droga intravenosa..	36
<b>Figura 8</b>	Ciclo GABA-Glu em neurônios (N) e astrócitos (A).....	38
<b>Figura 9</b>	Figuras ilustrativas dos receptores GABA <sub>A</sub> (GABA <sub>ARs</sub> ).....	39
<b>Figura 10</b>	Efeito da administração crônica de BDZs em GABA <sub>AR</sub> .....	40
<b>Figura 11</b>	Participação do ácido gama-amino-butírico (GABA) na cascata bioquímica do sistema recompensa.....	41
<b>Figura 12</b>	Terpenos com atividade sobre os GABA <sub>ARs</sub> e seus respectivos efeitos anticonvulsivantes e ansiolíticos.....	43
<b>Figura 13</b>	Estrutura química do Borneol.....	44
<b>Figura 14</b>	Estrutura química do (+) e (-) - Borneol.....	44
<b>Figura 15</b>	Biossíntese dos Terpenos.....	45
<b>Figura 16</b>	Tempo médio da concentração de Borneol natural no cérebro de camundongos após uma única dose de 1,2 g/kg, por via oral...	46
<b>Figura 17</b>	Curva de concentração do Borneol no cérebro de ratos.....	47
<b>Figura 18</b>	Proposta de mecanismo de neuroproteção mediado pelo Borneol.....	50
<b>Capítulo I</b>		
<b>Figura 1</b>	Estrutura química do (-) - Borneol [(-) - BOR].....	65
<b>Figura 2</b>	Efeito do (-) - BOR (25, 50 e 100 mg/kg, i.p.) e do DZP (2 mg/kg, i.p.) no labirinto em cruz elevado com camundongos....	69
<b>Figura 3</b>	Efeito do (-) - BOR (25, 50 e 100 mg/kg, i.p.) e do DZP (2 mg/kg, i.p.) no modelo campo aberto com camundongos.....	69
<b>Figura 4</b>	Efeito do (-) - BOR (25, 50 e 100 mg/kg, i.p.) e do DZP (2 mg/kg, i.p.) no modelo caixa claro-escuro com camundongos...	70

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 5</b>	Efeito do (-) - BOR (25, 50 e 100 mg/kg, i.p.) e do DZP (2 mg/kg, i.p.) no TPSI em camundongos.....	71
<b>Figura 6</b>	Diagrama de energia correlacionada com conformação obtida ao fim do cálculo funcional de densidade.....	71
<b>Figura 7</b>	Docagem molecular entre (-) - BOR e o GABA <sub>A</sub> R.....	72
<b>Figura 8</b>	Ilustração do sítio de ligação do DZP e a provável região, extracelular, na qual o monoterpeno (-) - BOR liga-se ao GABA <sub>A</sub> R.....	76
<b>Capítulo II</b>		
<b>Figura 1</b>	Estrutura química do (-) - Borneol [(-) - BOR].....	85
<b>Figura 2</b>	Diagrama esquemático do modelo de PCL.....	87
<b>Figura 3</b>	Efeito da pré-administração de (-) - BOR (25, 50 e 100 mg/kg, i.p.) no PCL por MOR (5 mg/kg, i.p.).....	90
<b>Figura 4</b>	Avaliação genotóxica do (-) - BOR (100 mg/kg, i.p.) através do ensaio do cometa em sangue periférico de camundongos.....	92
<b>Capítulo III</b>		
<b>Figura 1</b>	Efeito da pré-administração de (-) - BOR (25, 50 e 100 mg/kg, i.p.) no dano ao DNA induzido por MOR (5 mg/kg, i.p.) em hipocampo e CPF de camundongos pelo parâmetro de % de DNA na cauda.....	110
<b>Figura 2</b>	Efeito da administração de (-) - BOR (25, 50 e 100 mg/kg, i.p.) no dano ao DNA induzido por MOR (5 mg/kg, i.p.) em hipocampo e CPF de camundongos pelo parâmetro de comprimento de cauda (CC) do DNA.....	111
<b>Figura 3</b>	Efeito da administração de (-) - BOR (25, 50 e 100 mg/kg, i.p.) no dano ao DNA induzido por MOR (5 mg/kg, i.p.) em hipocampo e CPF de camundongos pelo parâmetro Tail moment (TM).....	111
<b>Figura 4</b>	Efeito da administração de 50 µl de (-) - BOR (1 mM) e MOR (10 <sup>-6</sup> mM) na atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH) em cultura primária de células de hipocampo e CPF de camundongos.....	112

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AAS	Ácido Acetil-salicílico
AC	Adenilato Ciclase
Acetil-CoA	Acetil Coenzima A
ADT	Auto Dock Tools
ANOVA	Análise de Variância
Asp	Aspartato
ATV	Área Tegumentar Ventral
Bcrp	Proteínas de resistência ao câncer de mama
BDZs	Benzodiazepínicos
BHC	Barreira Hematoencefálica
BS	Borneol sintético
CaMK II	Ca <sup>2+</sup> /calmodulina II
CC	Comprimento da cauda
CICLO	Ciclofosfamida
COF	Córtex Órbita-frontal
CPF	Córtex Pré-frontal
DA	Dopamina
DFT	Teoria do Funcional da Densidade
DMAPP	Dimetilalil difosfato
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DXP	1-Desoxi-Dexilulose 5-fosfato
DZP	Diazepam
EI	Estímulo Incondicionado
EC	Estímulo Condicionador
E.P.M.	Erro Padrão da Média
EROS	Espécies Reativas de Oxigênio
FDP	Farnesil difosfato
Fen77	Fenilalanina 77
Fen186	Fenilalanina 186
GABA	Ácido Gama-amino-butírico
GABAR	Receptor do Ácido Gama-amino-butírico
GABA <sub>A</sub> R	Receptor do Ácido Gama-amino-butírico do Tipo A
GABA <sub>B</sub> R	Receptor do Ácido Gama-amino-butírico do Tipo B
GliRs	Receptores de Glicina
Glu	Glutamato
Glu185	Glutamina 185
GPP	Geranyl difosfato
IPP	Isopentenil difosfato
i.p.	Intraperitoneal
LDH	Lactato Desidrogenase

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

Lis105	Lisina 105
Lis274	Lisina274
Min	Minuto
MOR	Morfina
mM	Milimolar
NA	Noradrenalina
NAC	<i>Nucleus accubens</i>
nAchRs	Receptores de Acetilcolina
OAA	Oxaloacetato
ONU	Organização das Nações Unidas
P-gp	P-glicoproteína
PCL	Preferência Condicionada por Lugar
PRM	Resistência a múltiplas drogas
PTZ	Pentilenotetrazol
S	Segundo
SNC	Sistema Nervoso Central
TCA	Ácido Tricarboxílico
THC	Tetra-hidro-canabinóide
Tir160	Tirosina 160
Tir210	Tirosina 210
TM	TailMoment
TRPA1	Receptor potencial transitório vanilóide tipo I
Val 50	Valina 50
$\alpha$ -KG	$\alpha$ -Cetogluturato
$\mu$ l	Microlitro
$\mu$ M	Micromolar
5-HT	Serotonina
5-HT3Rs	Receptor de serotonina do tipo 3
(-) - BOR	(-) – Borneol
®	Marca registrada

**LISTA DE TABELAS****Referencial  
Teórico**

<b>Tabela 1</b>	Grupos e tipos de modelos animais utilizados na pesquisa por drogas ansiolíticas.....	<b>25</b>
-----------------	---	-----------

**Capítulo I**

<b>Tabela 1</b>	Dados comparativos das três melhores conformações entre (-) - BOR e o GABA <sub>A</sub> R.....	<b>72</b>
-----------------	--	-----------

<b>Tabela 2</b>	Comparação entre os sítios de ligação do (-) - BOR e do DZP com o GABA <sub>A</sub> R.....	<b>75</b>
-----------------	--	-----------

**Capítulo II**

<b>Tabela 1</b>	Efeito do (-) - BOR (25, 50 e 100 mg/kg, i.p.) nos sintomas de abstinência por MOR (5 mg/kg, i.p.) após a administração de naloxona (8 mg/kg, i.p.).....	<b>91</b>
-----------------	--	-----------

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	<b>viii</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>ix</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>x</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SIMBOLOS</b> .....	<b>xii</b>
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	<b>xiv</b>
<b>SUMÁRIO</b> .....	<b>xv</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>16</b>
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>21</b>
2.1 Objetivo Geral.....	21
2.2 Objetivos Específicos.....	21
<b>3 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>22</b>
3.1 Ansiedade: definição e caracterização.....	22
3.2 Modelos animais utilizados na busca por novas drogas ansiolíticas.....	24
3.3 Adicção a drogas: histórico, problemática social e neurobiologia de opióides e psicoestimulantes.....	28
3.4 Modelos animais na pesquisa para adicção a drogas.....	34
3.5 O GABA: Biossíntese, receptores e alvo farmacológico no tratamento da ansiedade e adicção.....	37
3.6 Monoterpenos como alternativa terapêutica e os efeitos centrais do (+) e (-) Borneol.....	42
<b>CAPÍTULO I: Efeito ansiolítico/sedativo do monoterpeno (-) - Borneol em camundongos e sua interação molecular com o GABA<sub>A</sub>R</b> .....	<b>61</b>
Resumo.....	62
Abstract.....	63
Introdução.....	64
Material e Métodos.....	65
Resultados.....	68

## SUMÁRIO

Discussão.....	73
Conclusões.....	76
Referências.....	76
<b>CAPÍTULO II: Efeito <i>in vivo</i> do (-) - Borneol sobre a adicção/abstinência por morfina e sua avaliação genotóxica em sangue periférico de camundongos.....</b>	<b>81</b>
Resumo.....	82
Abstract.....	83
Introdução.....	84
Material e Métodos.....	85
Resultados.....	89
Discussão.....	92
Conclusões.....	96
Referências.....	96
<b>CAPÍTULO III: Efeito neuroprotetor do (-) - Borneol sobre a fragmentação de DNA induzida por morfina no córtex pré-frontal e hipocampo de camundongos adultos.....</b>	<b>102</b>
Resumo.....	103
Abstract.....	104
Introdução.....	105
Material e métodos.....	106
Resultados.....	109
Discussão.....	112
Conclusões.....	114
Referências.....	114
<b>4. CONCLUSÕES.....</b>	<b>118</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>119</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Psicotr3picos s3o drogas que agem sobre o Sistema Nervoso Central (SNC) produzindo altera33es de comportamento, humor e cogni33o. Os psicotr3picos possuem grande propriedade refor3adora sendo, portanto, pass3veis de autoadministra33o (ABORAYA et al., 2006). Esses f3rmacos s3o utilizados no tratamento de diversas patologias como: depress3o (IOANNIDIS, 2008), esquizofrenia (LIPEROTI; PEDONE; CORSONELLO, 2008), transtorno bipolar (M3LLER; NASRALLAH, 2003), epilepsia (GAITATZIS; SANDER, 2013) e ansiedade (LIU et al., 2010).

Drogas psicotr3picas como a clorpromazina, imipramina e o diazepam, foram desenvolvidas quando a maioria dos neurotransmissores ainda n3o tinham sido descobertos e quando se conhecia muito pouco sobre a fisiologia desses neurotransmissores (SCHULZ; STEIMER, 2000). Seus mecanismos de a33o podem ser espec3ficos, como os inibidores seletivos de recapta33o de serotonina (ISRS) ou com pouca especificidade como a clorpromazina, droga que age antagonizando a neurotransmiss3o serotonin3rgica, dopamin3rgica, colin3rgica, adren3rgica e histamin3rgica (SCHULZ; STEIMER, 2000).

No mundo, a quantia em dinheiro gasta com psicotr3picos vem aumentando, partindo de um valor estimado em US\$ 2,8 bilh3es em 1987 para quase US\$ 18 bilh3es em 2001, um aumento maior do que com outros grupos terap3uticos. Por exemplo, em 2003 os gastos com medicamentos antidepressivos e antipsic3ticos aumentaram 11,9 % e 22,1%, respectivamente, enquanto que no mesmo ano, os gastos com outros medicamentos aumentaram 11,5% (FRANK; CONTI; GOLDMAN, 2005). No ano de 2009, os gastos com prescri33es de psicotr3picos tiveram um aumento ainda maior, chegando a 38% (HODGKIN et al., 2016). No Brasil, sabe-se que as drogas psicotr3picas mais prescritas s3o os benzodiazep3nicos (BDZs) onde 3,3% da popula33o utilizam diariamente esse grupo terap3utico (GALDUR3Z et al., 2005; AZEVEDO et al., 2016).

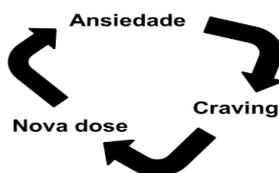
Efeitos adversos em comum podem ser observados em drogas que agem sobre o SNC como 3 o caso dos BDZs e opi3ides. Pacientes que necessitam de tratamento com BDZs ou opi3ides desenvolvem toler3ncia e acabam por tornar-se adictos (BONHOMME et al., 2012; HOOD et al., 2014; KLEBER, 2007). Adic33o a drogas 3 considerada uma forma patol3gica de aprendizado. Parece haver uma "usurpa33o patol3gica" dos

mecanismos neurais de aprendizagem e memória que, sob circunstâncias normais, servem para moldar comportamentos de sobrevivência relacionados à recompensa na busca por alimentos, na saciedade da sede e na reprodução (GOSNELL; LEVINE, 2009; GOULD, 2010).

O mecanismo neurobiológico da adicção a drogas baseia-se na teoria do reforço positivo ou negativo. O reforço positivo é o mais comum. A procura por mais doses da substância deve-se ao fato do usuário relatar “gostar” do seu efeito (ex. cocaína e anfetaminas). O reforço negativo, por sua vez, refere-se a procura da substância com o objetivo de reduzir sintomas negativos durante a abstinência (ex. álcool, tabaco, opióides e BDZs) (LEE et al., 2010). De modo geral, a adicção a drogas caracteriza-se por: (i) compulsão pela procura e ingestão da droga (ii) perda de controle no seu uso (iii) surgimento de estados emocionais negativos (por exemplo, disforia, ansiedade e irritabilidade) quando o usuário é impedido de ter acesso à substância a qual é adicto (KOOB; VOLKOW, 2010). No aspecto neurobiológico, o comportamento adictivo resulta de descargas dopaminérgicas em áreas do sistema mesocorticolímbico (também conhecido como sistema recompensa) desencadeando sensação prazerosa e com isso um comportamento de procura por novas doses o que reforça o seu consumo (NESTLER, 2008).

O uso prolongado de BDZs e opióides resulta no aparecimento de sintomas negativos como ansiedade e depressão característicos da síndrome de abstinência à essas substâncias (BONHOMME et al., 2012; HOOD et al., 2014; KLEBER, 2007). O comportamento do consumo de drogas reforçadoras negativas ocorre através do ciclo: ansiedade, “craving” ou fissura e novo consumo da substância (**Figura 1**) (DUKA et al., 2002). Assim, o tratamento da ansiedade durante a abstinência ou craving é ponto chave para se prevenir recaídas (WEISS, 2005).

**Figura 1.** Ciclo de autoadministração de substância adicta (ex. álcool, tabaco, opióides e benzodiazepínicos).



**Fonte:** adaptado de DUKA et al., 2002

Moléculas obtidas a partir de produtos naturais como o Borneol podem ser alternativas para o tratamento da ansiedade e prevenção à adicção a drogas lícitas e ilícitas. O Borneol é classificado como natural e sintético. O Borneol natural pode ser obtido a partir da resina de plantas como *Cinnamomum camphora* (rica em (+) - Borneol) ou *Blumea balsamifera* (rica em (-) - Borneol). O Borneol sintético, pode ser produzido por simples transformação química da cânfora e é muitas vezes utilizado na China como um substituto para o produto natural (LI et al., 2012; XU et al., 2014). Possíveis efeitos farmacológicos foram relatados com o Borneol, dentre essas atividades podemos citar as ações sobre o ácido gama-aminobutírico (GABA) como a redução de convulsões induzidas por pentilenotetrazol (PTZ) (QUINTANS-JÚNIOR et al., 2010) e a modulação positiva do receptor humano recombinante de GABA<sub>A</sub>  $\alpha 1\beta 2\gamma 2L$  (GRANGER; CAMPBELL; JOHNSTON, 2005). Este trabalho teve o objetivo de investigar o efeito ansiolítico e antiadictivo do (-) - Borneol sintético com o intuito de contribuir com maiores informações farmacológicas e toxicológicas sobre este monoterpeneo, visando um embasamento maior da molécula como uma alternativa terapêutica no tratamento da ansiedade e da adicção à morfina.

Portanto, com intuito de melhor expor os dados obtidos na pesquisa esta tese apresenta-se dividida em 3 capítulos/artigos: **Capítulo I** - Efeito ansiolítico/sedativo do monoterpeneo (-) - Borneol em camundongos e sua interação molecular com o GABA<sub>A</sub>R; **Capítulo II** - Efeito *in vivo* do (-) - Borneol sobre a adicção/abstinência por morfina e sua avaliação genotóxica em sangue periférico de camundongos e **Capítulo III** - Efeito neuroprotetor do (-) - Borneol sobre a fragmentação de DNA induzida por morfina no córtex pré-frontal e hipocampo de camundongos adultos.

## REFERÊNCIAS

ABORAYA, A.; RANKIN, E.; FRANCE, C.; EL-MISSIRY, A.; JOHN, C. The reliability of psychiatric diagnosis revisited: The clinician's guide to improve the reliability of psychiatric diagnosis. **Psychiatry**, v. 3, n. 304, p. 41–50, 2006.

AZEVEDO, Â. J.; ARAUJO, A. A.; FERREIRA, M. F. Consumption of anxiolytic benzodiazepines: a correlation between SNGPC data and sociodemographic indicators in Brazilian capitals. **Ciênc. saúde coletiva**, v.21, n.1, p.83-90, 2016.

BONHOMME, J.; SHIM, R. S.; GOODEN, R.; TYUS, D.; RUST, G. Opioid addiction and abuse in primary care practice: a comparison of methadone and buprenorphine as treatment options. **Journal of the National Medical Association**, v. 104, n. 7–8, p. 342–50, 2012.

DUKA, T; TOWNSHEND, J. M.; COLLIER, K.; STEPHENS, D. N. Kindling of withdrawal: a study of craving and anxiety after multiple detoxifications in alcoholic inpatients. **Alcoholism, clinical and experimental research**, v. 26, n. 6, p. 785–795, 2002.

FRANK, R. G.; CONTI, R. M.; GOLDMAN, H. H. Mental health policy and psychotropic drugs. **The Milbank quarterly**, v. 83, n. 2, p. 271–98, 2005.

GAITATZIS, A.; SANDER, J. W. The long-term safety of antiepileptic drugs. **CNS Drugs**, v. 27, n. 6, p. 435–455, 2013.

GALDURÓZ, J. C.; NOTO, A. R.; NAPPO, S. A.; CARLINI, E. A. Use of psychotropic drugs in Brazil: household survey in the 107 biggest Brazilian cities--2001. **Revista latino-americana de enfermagem**, v. 13 Spec No, p. 888–895, 2005.

GOSNELL, B. A; LEVINE, A S. Reward systems and food intake: role of opioids. **International journal of obesity**, v. 33 Suppl 2, n. S2, p. S54-8, 2009.

GOULD, T. J. Addiction and cognition. **Addiction science & clinical practice**, v. 5, n. 2, p. 4–14, 2010.

HODGKIN, D.; THOMAS, C. P.; O'BRIEN, P. L.; LEVIT, K.; RICHARDSON, J.; MARK, T. L.; MALONE, K. Projected Spending on Psychotropic Medications 2013–2020. **Administration and Policy in Mental Health and Mental Health Services Research**, v. 43, n. 4, p. 497–505, 2016.

HOOD, S. D.; NORMAN, A.; HINCE, D. A.; MELICHAR, J. K.; HULSE, G. K. Benzodiazepine dependence and its treatment with low dose flumazenil. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 77, n. 2, p. 285–294, 2014.

IOANNIDIS, J. P. Effectiveness of antidepressants: an evidence myth constructed from a thousand randomized trials? **Philosophy, Ethics, and Humanities in Medicine**, v. 3, p. 14, 2008.

KLEBER, H. D. Pharmacologic treatments for opioid dependence: Detoxification and

maintenance options. **Dialogues in Clinical Neuroscience**, v. 9, n. 4, p. 455–470, 2007.

KOOB, G. F.; VOLKOW, N. D. Neurocircuitry of addiction. **Neuropsychopharmacology: official publication of the American College of Neuropsychopharmacology**, v. 35, n. 1, p. 217–238, 2010.

LEE, H. C., KO, N. Y.; LEE, N. Y.; CHANG, C. M.; LIU, S. Y.; KO, W. C. Trends in sexually transmitted diseases and risky behaviors among HIV-infected patients at an outpatient clinic in southern Taiwan. **Sexually Transmitted Diseases**, v. 37, n. 2, p. 86–93, 2010.

LI, W. R.; CHEN, R. Y.; YANG, L.; HUANG, T. L.; XU, Q. W.; MI, S. Q.; WANG, N. S. Pharmacokinetics of natural borneol after oral administration in mice brain and its effect on excitation ratio. **European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics**, v. 37, n. 1, p. 39–44, 2012.

LIPEROTI, R.; PEDONE, C.; CORSONELLO, A. Antipsychotics for the treatment of Behavioral and Psychological Symptoms of Dementia (BPSD). **Current Neuropsychopharmacology**, v. 6, n. 2, p. 117–124, 2008.

LIU, X.; YE, W.; WATSON, P.; TEPPER, P. Use of benzodiazepines, hypnotics, and anxiolytics in major depressive disorder: association with chronic pain diseases. **The Journal of nervous and mental disease**, v. 198, n. 8, p. 544–550, 2010.

MÖLLER, H.-J.; NASRALLAH, H. A. Treatment of bipolar disorder. **The Journal of clinical psychiatry**, v. 64 Suppl 6, n. 9878, p. 9–17; discussion 28, 2003.

NESTLER, E. J. Epigenetic Mechanisms of Drug Addiction. **Neuropharmacology**, v. 144, n. 5, p. 724–732, 2008.

QUINTANS-JÚNIOR, L. J.; GUIMARÃES, A. G.; ARAÚJO, B. E. S.; OLIVEIRA, G. F.; SANTANA, M. T.; MOREIRA, F. V.; SANTOS, M. R. V.; CAVALCANTI, S. C. H.; JÚNIOR, W. DE L.; BOTELHO, M. A.; RIBEIRO, L. A. A.; NÓBREGA, F. F. F.; ALMEIDA, R. N. Carvacrol, borneol and citral reduce convulsant activity in rodents. **African Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 39, p. 6566–6572, 2010.

SCHULZ, P.; STEIMER, T. Psychotropic medication, psychiatric disorders, and higher brain functions. **Dialogues in clinical neuroscience**, v. 2, n. 3, p. 177–82, 2000.

UMEZU, T.; NAGANO, K.; ITO, H.; KOSAKAI, K.; SAKANIWA, M.; MORITA, M. Anticonflict effects of lavender oil and identification of its active constituents. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 85, n. 4, p. 713–721, 2006.

WEISS, F. Neurobiology of craving, conditioned reward and relapse. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 5, n. 1, p. 9–19, 2005.

XU, P.; LI, Y.; DU, S. Y.; LU, Y.; BAI, J.; GUO, Q. L. Comparative pharmacokinetics of borneol in cerebral ischemia-reperfusion and sham-operated rats. **Journal of Zhejiang University. Science. B**, v. 15, n. 1, p. 84–91, 2014.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

- Realizar estudos farmacológicos com o monoterpene (-) - Borneol em modelos animais *Swiss Webster* contribuindo para o desenvolvimento novas opções terapêuticas na prevenção e tratamento da ansiedade e adicção.

### 2.2. Objetivos Específicos

- Investigar o efeito sedativo do (-) - Borneol em modelo de potencialização do tempo de sono induzido por tiopental sódico;
- Verificar o efeito ansiolítico das doses de 25, 50 e 100 mg/kg, do (-) - Borneol, por via intraperitoneal (i.p.), em camundongos *Swiss Webster* utilizando para isso os seguintes modelos: teste da caixa claro-escuro, teste do labirinto em cruz elevado e teste do campo aberto;
- Determinar, através de docagem molecular, a interação entre o (-) - Borneol e o receptor gama-aminobutírico do tipo A (GABA<sub>A</sub>R);
- Verificar o efeito das doses de 25, 50 e 100 mg/kg, (i.p.) do (-) - Borneol sobre o tempo de Preferência Condicionada por Lugar (PCL) desenvolvido por morfina (5 mg/kg, i.p.);
- Observar qual efeito da administração das doses de 25, 50 e 100 mg/kg, (i.p.) de (-) - Borneol produzem sobre os sintomas da síndrome de abstinência por morfina (5 mg/kg, i.p.) em camundongos *Swiss Webster*;
- Verificar por meio do teste do cometa o potencial genotóxico da molécula de (-) - Borneol em sangue periférico de camundongos *Swiss Webster*;
- Investigar a neuroproteção do (-) - Borneol (100 mg/kg, i.p.) sobre a fragmentação de DNA por morfina (5 mg/kg, i.p.) no hipocampo e córtex pré-frontal de camundongos.

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 Ansiedade: definição e caracterização

Em 1621, Robert Burton descreveu os sintomas de ansiedade em seu livro *A anatomia da melancolia* da seguinte forma: "O medo causa muitos efeitos lamentáveis no homem, como ficar vermelho, pálido, tremer, suar; repentinamente faz-se frio e calor sobre todo o corpo, palpitação do coração, síncope, etc" (BANDELOW; MICHAELIS, 2015). Atualmente, a ansiedade é definida como um sentimento vago e desagradável de medo, apreensão, caracterizado por tensão ou desconforto derivado de antecipação de perigo, de algo desconhecido ou estranho. O transtorno de ansiedade pode se expressar de forma diferente em cada indivíduo podendo variar de acordo com fatores relacionados ao paciente. Assim, o transtorno pode apresentar-se como perturbação de pânico, ansiedade generalizada, agorafobia, fobia social, fobia específica e ansiedade de separação (BLACKWELDER; BRAGG, 2016; CASTILLO et al., 2000).

Dentre todas as doenças mentais, a ansiedade é a mais prevalente no mundo, afetando de forma especial os jovens (KASTEENPOHJA et al., 2015). O estresse é um fator relevante no surgimento da ansiedade (MARGIS et al., 2003). De acordo com uma pesquisa mundial sobre saúde mental, existe uma diferença significativa na prevalência da doença por continente. Por exemplo, na China a prevalência é em torno de 4.8% enquanto que nos Estados Unidos da América a prevalência atinge o elevado número de 31% (KASTEENPOHJA et al., 2015).

A ansiedade é um componente normal do repertório comportamental humano e é importante como mecanismo de defesa, no que se refere a capacidade de resposta em lidar com situações novas. No entanto, quando é excessivamente frequente ou aparece em contextos inadequados, pode interferir na qualidade de vida do cidadão e portanto, ser considerada patológica (DOUKKALI et al., 2015). A ansiedade é mais comum em mulheres do que em homens. Para mulheres, a prevalência gira em torno de 7% e para o homem, esse valor cai para 4% (BLACKWELDER; BRAGG, 2016).

Os sintomas de ansiedade surgem por um distúrbio no equilíbrio entre os centros emocionais e os centros cognitivos mais elevados. Estudos de neuroimagem demonstram o envolvimento de áreas mesocorticolímbicas. Por exemplo, regiões mesolímbicas como as amígdalas cerebrais, responsável por sintomas de medo e pânico, estão muito reativas.

Parece haver um distúrbio na função de regulação emocional por parte do Córtex pré-frontal (CPF) e orbito-frontal (COF). O CPF é responsável por funções executivas, tais como planejamento, tomada de decisões, consequências de potenciais comportamentos e compreensão/moderação de comportamento. O COF codifica informações, controla impulsos e regula o humor. No cérebro saudável, essas regiões corticais regulam impulsos, emoções e comportamento através de um controle inibitório no sentido córtex-sistema mesolímbico. A última área a ser citada, envolvida com o transtorno da ansiedade seria o hipocampo. Em animais, o hipocampo ventral (hipocampo anterior humano) regula a ansiedade endógena, enquanto que o hipocampo dorsal (Hipocampo posterior humano) está envolvido na memória, incluindo a memória relacionada ao medo (ETKIN, 2012; MARTIN et al., 2010).

O transtorno de ansiedade, que até há pouco tempo era visto como algo menos grave, tem ganho conotações de uma doença crônica de grande demanda nos serviços de saúde. Estipula-se que cerca de 24% dos pacientes que necessitam de serviços médicos hospitalares estão acometidos pela doença (ANDREATINI; BOERNGEN-LACERDA; FILHO, 2001).

Existem abordagens diferentes para o tratamento da ansiedade. Uma delas é a não farmacoterapêutica que se baseia em amenizar e melhorar a qualidade do estilo de vida do paciente como o exercício físico, yoga e meditação. A efetividade desses métodos, tem sido avaliada. O yoga, por exemplo, tem demonstrado ser mais eficaz que o placebo e tão bom quanto o tratamento farmacoterapêutico com o detalhe de não apresentar efeitos adversos (BLACKWELDER; BRAGG, 2016).

Contudo, a forma principal de tratamento ainda continua sendo a farmacoterapêutica. Dentro dos grupos utilizados para tratamento, destacam-se os BDZs, medicamentos lançados nos anos 60 e que rapidamente se popularizaram ganhando espaço na clínica médica. Porém, os BDZs possuem efeitos adversos como: declínio cognitivo, sedação indesejada, coordenação reduzida, aumento do risco de acidentes, comprometimento da memória, alterações do humor e fadiga. Além disso, o uso em longo prazo pode levar a tolerância, dependência física e psicológica e síndrome da abstinência (ANDREATINI; BOERNGEN-LACERDA; FILHO, 2001).

A despeito da terapia farmacológica da ansiedade ter avançado muito nos últimos anos com os BDZs e com medicamentos como a buspirona, agonistas parciais de receptores  $\gamma$ -aminobutíricos (GABA) e inibidores seletivos da receptação de serotonina (5-HT), os efeitos adversos são obstáculos que limitam o tratamento da doença (BLACKWELDER; BRAGG, 2016). Logo, o desenvolvimento e a busca por novas drogas com efeito ansiolítico ainda se faz necessária. O conhecimento sobre como se realizar triagens de moléculas com potencial ansiolítico é extremamente necessário. Para isso existem modelos animais que simulam o processo ansiogênico e que são importantíssimos na busca por fármacos ansiolíticos com menos efeitos adversos.

### **3.2 Modelos animais utilizados na busca por novas drogas ansiolíticas**

A utilização de modelos animais no estudo da ansiedade é algo que ainda gera polêmica pois ansiedade é algo subjetivo, característica presente em humanos e difícil de ser medido em animais. Então, considera-se que, de certa forma, a ansiedade só pode ser modelada e não reproduzida em animais (ANDREATINI; BOERNGEN-LACERDA; FILHO, 2001). Entretanto, a despeito das dificuldades em se aceitar que modelos animais e as dúvidas em não reproduzirem, com verossimilhança, o que se passa no cérebro humano, esses modelos são imprescindíveis como ferramenta na análise da multiplicidade de causas genéticas, ambientais ou farmacológica da doença (BOURIN, 2015).

Os modelos animais podem ser agrupados em dois tipos de classes. O primeiro tipo são os modelos condicionados ao estresse e à dor (ex. choques elétricos). O segundo grupo refere-se a reações espontâneas dos animais (ex. congelamento “freezing”) que não estão relacionadas à dor e desconforto (ex. exposição do animal à uma câmara iluminada ou a um predador) (**Tabela 1**) (HANDLEY, 1995). Podemos ressaltar aqui os modelos animais de ansiedade não condicionados. Estão agrupados nesses testes o labirinto em cruz elevado, caixa claro escuro e o campo aberto. Esses modelos são os mais utilizados na investigação de novas moléculas ou alvos bioquímicos no tratamento da ansiedade (ENNACEURA, 2016).

De certa forma, todos esses modelos referem-se à um desafio apresentado ao animal. Nos testes, o desafio é representado por um ambiente novo que desencadeia comportamentos típicos não condicionados quando os roedores são colocados em

ambientes desconhecidos. Abaixo, a descrição dos princípios básicos dos principais modelos não condicionados.

**Tabela 1.** Grupos e tipos de modelos animais utilizados na pesquisa por drogas ansiolíticas

<b>Respostas condicionadas</b>	<b>Respostas não condicionadas</b>
Teste de Vogel	Caixa claro-escuro
Testes das quatro placas	Interação social
Resposta emocional condicionada	Campo aberto
Teste de aversão condicionado	Vocalização ultrassônica (dor ou separação)
Sobressaltos potencializados pelo medo	Testes de ansiedade como defesa
Teste de esconder esferas	Teste da escada
Evasão ativa/passiva	Placa furada
Estimulação elétrica do cérebro	Exposição ao predador

**Fonte:** HANDLEY, 1995

#### *Teste do labirinto em cruz elevado*

Inicialmente esses teste foi desenvolvido para ratos, mas atualmente é também utilizado com porquinhos da índia, camundongos e hamsters (BOURIN, 2015). O aparato chamado de labirinto em cruz elevado é composto por quatro braços que irradiam de uma plataforma central em forma do símbolo matemático da adição e que se eleva a partir do chão com dois braços com paredes fechadas em oposição aos dois braços abertos (**Figura 1**). O experimento inicia-se quando o animal é colocado na área central do labirinto com a cabeça voltada para um dos braços fechados. O experimento todo é realizado em um período de tempo determinado (ENNACEURA, 2016).

Existe um comportamento padrão entre os animais submetidos ao teste. Ao serem colocados na área central os animais direcionam-se, inicialmente, para os braços fechados, passando em seguida novamente para a área central e depois para os braços abertos. Com a utilização de ansiolíticos esse comportamento é alterado. Como medida para o efeito ansiolítico é utilizado o parâmetro de tempo gasto nessa área do labirinto. Assim, quanto mais tempo ele permanece lá, maior será o efeito ansiolítico da molécula

testada isso se o resultado for significativo em relação ao grupo controle (COLLA et al., 2015).

**Figura 1.** Exemplo de aparato para o teste do labirinto em cruz elevado



**Fonte:** Arquivo pessoal (2017).

#### *Teste da caixa claro-escuro*

Assim como o teste do labirinto em cruz elevado, o teste da caixa claro-escuro foi desenvolvido para ser utilizado em ratos (KULESSKAYA; VOIKAR, 2014). O teste baseia-se na característica inata dos roedores em ter aversão por áreas iluminadas e no comportamento exploratório induzido por novidade. Portanto, o conflito consiste no comportamento característico de conhecer o novo, mas também em evitar o desconhecido (neofobia) (HASCOËT; BOURIN, 2009).

O aparato utilizado pode ter diferenças, como os tamanhos entre as áreas clara-escuro (1:2), a cor das duas áreas (branca/preta) e a iluminação entre as áreas (iluminada e sem iluminação) (**Figura 2**). Logo, quando os animais são colocados na área clara eles tendem a se deslocar para a área escura (BOURIN, 2015).

As substâncias testadas que provocarem um aumento da atividade locomotora do animal no sentido da área clara e uma diminuição da atividade locomotora para a área escura, apresentarão um potencial efeito ansiolítico.

**Figura 2.** Exemplo de aparato utilizado no teste da caixa claro-escuro



**Fonte:** Arquivo pessoal (2017).

O que é avaliado no teste é a quantidade de vezes que o animal entra na área clara e o tempo em que este permanece em cada entrada. Portanto, quanto menos aversão o animal possuir pela área clara menos ansioso ele estará (HASCOËT; BOURIN, 2009).

#### *Teste do campo aberto*

O campo aberto, descrito inicialmente por Siegel (1946) e validado por Archer (1973), tem sido utilizado como ferramenta na pesquisa sobre o comportamento com vários tipos de espécies como por exemplo, aranhas, pássaros e principalmente mamíferos. O aparato onde é realizado o teste é dividido em quadrantes iguais, mas o tamanho e formato podem variar (**Figura 3**). Inicialmente foi desenvolvido para o estudo da psicologia comportamental espalhando-se, rapidamente, para outras áreas neurocientíficas como a psicofarmacologia (CHOLERIS, 2001).

O teste baseia-se na tendência natural que os roedores possuem em evitar a área central de um ambiente aberto desconhecido, permanecendo, a maior parte do tempo, na periferia do novo ambiente protegendo-se contra eventuais predadores. Drogas ansiolíticas aumentam as entradas e o tempo gasto nas áreas centrais do aparato (MENARD; TREIT, 1999). Na pesquisa por drogas ansiolíticas, também pode ser utilizado na avaliação das respostas não específicas ou efeitos adversos. Por exemplo, o campo aberto pode ser útil para se avaliar o quanto uma droga pode alterar

comportamentos não relacionados à ansiedade como a sua influência sobre o sono (MENARD; TREIT, 1999).

**Figura 3.** Exemplo de aparato utilizado no teste do campo aberto



**Fonte:** Arquivo pessoal (2017).

Todos os modelos descritos acima são muito utilizados em pesquisas pré-clínicas no estudo do comportamento da ansiedade e efeitos farmacológicos de moléculas com potencial ansiolítico.

### **3.3 Adicção a drogas: histórico, problemática social e neurobiologia de opioides e psicoestimulantes.**

A busca por drogas úteis no tratamento da dor levou a humanidade ao isolamento de substâncias presentes em plantas utilizadas milenarmente na cura do sofrimento humano. A droga mais antiga conhecida pelo homem é o ópio. Os conhecimentos dos seus efeitos remontam do antigo Egito, dos Balcãs ou do Mar Negro, sendo obtido através de métodos de colheita e preparação relativamente simples. Rotas comerciais desbravadas por árabes popularizaram o ópio por toda a Pérsia, Índia, China, África do Norte e Espanha deixando para trás registros escritos de propriedades e formas de uso (MARKEL, 2011; BROWNSTEIN, 1993; DUARTE, 2005; FERREIRA E MARTINI, 2001).

O livro *A Odisseia* escrita por Homero faz referência a uma mistura de ópio, conhecida como nepenthe, “uma droga que tinha o poder de roubar o sofrimento, a raiva e banir todas as memórias dolorosas”. Este relato pode estar referindo-se a uma mistura de ópio e álcool, conhecida mais tarde como laudanum. O ópio contém alcaloides como, por exemplo, a codeína e a morfina. A morfina é o principal componente do ópio e apesar de ter sido isolada em 1803 por Sertürner, sua estrutura foi elucidada somente 120 anos depois (GACH et al., 2011; ROBINSON; ADINOFF, 2016).

Segundo o relatório das Organizações das Nações Unidas (ONU), atualmente a heroína, um fármaco obtido a partir da acetilação da morfina, é consumida por 11 milhões de pessoas (UNODC, 2016; UNODC, 2015). Contudo, o uso indevido de opióides por meio de prescrições controladas também é um grave problema para a sociedade. Uma análise de cerca de 1000 mortes por overdose em Ontário, Canadá, indicaram que 56% desses indivíduos receberam prescrição de opióides nas 4 semanas anteriores a sua morte, sugerindo que a prescrição de drogas pode estar relacionada com as mortes, talvez associada com o mau uso (intencional ou acidental) ou adicção ao fármaco (KOTALIK, 2012).

Somando-se aos problemas de saúde resultantes de seu uso compulsivo e o combate ao seu comércio ilegal, o consumo dessas substâncias é responsável pelo aumento crescente de gastos com políticas de combate ao tráfico, a criminalidade e violência que lhe são característicos (MINAYO; DESLANDES, 1998; GARCÍA et al., 2002; COSTA; DE GRAUWE, 2009; WERB et al., 2011; MOREIRA, 2012; LEONE, 2012). Atualmente, esse fenômeno que anteriormente era atribuído a pessoas com fraca personalidade é melhor compreendido graças às pesquisas neurobiológicas que a cada dia avançam no sentido de esclarecer onde e como ocorre a biologia do seu mecanismo (KREEK et al., 2012; NATHAN; CONRAD; SKINSTAD, 2016). Apesar de durante muito tempo, a adicção a drogas ter sido entendida como um problema com mecanismo comum ou um problema de saúde com características universais, hoje está claro que os mecanismos são diferentes para os grupos de drogas diferentes. Teorias neurobiológicas que fundamentavam sua explicação, principalmente, através da ação de um único neurotransmissor (teoria dopaminérgica) estão sendo substituídas por conceitos mais complexos à medida que ocorrem avanços científicos como, por exemplo, o estudo epigenético e de fatores de transcrição na sinalização da memória a adicção a drogas

(NESTLER, 2008).

Em neurobiologia, sabemos que existem áreas específicas em nosso cérebro formadas por circuitos especializados que quando ativados nos proporcionam, mesmo que fugazmente, experiências extremamente prazerosas e gratificantes (URBAN; MARTINEZ, 2012; VOLKOW et al., 2012). Alcaloides como a morfina, assim como todas as substâncias químicas capazes de causar dependência (ex. cocaína) agem no SNC ao potencializar a liberação de neurotransmissores [ex. dopamina (DA), noradrenalina (NA), serotonina (5-HT) e Glutamato (Glu)] através da inibição de interneurônios que atuam impedindo a transmissão nervosa (ex. Ácido gama-aminobutírico - GABA) ou bloqueando suas recaptações. O resultado disso, após um uso crônico e abusivo, é o surgimento de novas conexões de neurônios, fenômeno conhecido como neuroplasticidade (DN STEPHENS, SL KING, JJ LAMBERT, D. BELELLI, 2016; KONRADI; HECKERS, 2001; MÁRQUEZ et al., 2016)

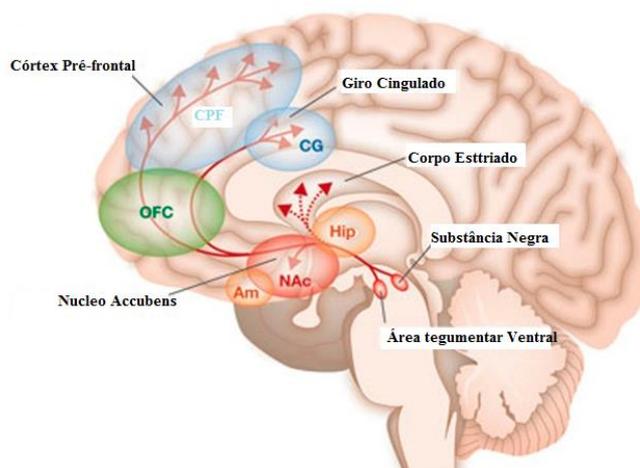
Essas áreas que hoje são conhecidas como *sistema recompensa* foram descobertas por acidente, no início dos anos 1950 na Universidade McGill quando o professor e cientista americano James Olds e seu aluno de pós-graduação Peter Milner estimularam, equivocadamente, com um eletrodo fixo, o hipotálamo de um rato. Como resultado, os dois observaram que o animal demonstrava “gostar” da sensação a ponto de voltar, espontaneamente, para o experimento (GARDNER, 2011). Logo após, Olds e Milner resolveram adaptar o protocolo experimental permitindo que o próprio animal se autoestimulasse, conseqüentemente o mesmo fazia toda vez em que lhe era dada essa possibilidade. Olds batizou essa região do cérebro de *área do prazer* e justificou sua existência tomando como base a necessidade de estímulos naturais serem reforçados por comportamentos de busca (ex. fome-procura por alimento e sede-busca por água) (WISE, 1978; VETULANI, 2001; KENNY, 2011). Esses comportamentos deveriam ser necessários para a sobrevivência do indivíduo e por isso a natureza produziria o prazer como recompensa aumentando assim a possibilidade destes se repetirem (EVERITT; ROBBINS, 2005; KOOB, 2013). Muitas outras descobertas surgiram a partir de então. Estudos de mapeamento neuroanatômico com eletrodos móveis foram usados e pesquisas utilizando métodos histoquímicos também. Assim, a área do prazer acidentalmente identificada por Olds e Milner tomou forma e foi, enfim, possível delimitá-la mostrando a intrincada rede de neurônios que compõem o sistema mesocorticolímbico (WISE, 2008;

RANJBARAN; SAHRAEI, 2014).

Basicamente, o sistema mesocorticolímbico (**Figura 4**) é formado pela via dopaminérgica mesolímbica composta por feixes de neurônios dopaminérgicos que partem da Área tegumentar ventral (ATV) atingindo o *Nucleus accubens* (NAc) e pela via mesocortical onde os feixes que se iniciam na ATV prolongam-se diretamente até o CPF (MAMELI; LÜSCHER, 2011). Na composição dessas vias o NAc destaca-se, pois quando estimulado por uma corrente de baixa energia ou por uma administração de DA de forma direta, suas células produzem sentimentos de prazer e satisfação. A função natural de sua ativação é fazer com que indivíduos priorizem atividades biológicas básicas, importantes para a sobrevivência de sua espécie. Portanto, quando uma pessoa sedenta mata sua sede ou alguém tem um orgasmo as células dopaminérgicas inundam o NAc com moléculas de DA. Conseqüentemente, a resposta a ativação dessas células o fazem se sentir bem, querer repetir a experiência e reviver essa sensação prazerosa (SCHULTZ, 1998; MAMELI; LÜSCHER, 2011).

Além do NAc outras regiões subcorticiais relacionadas com a memória também são ativadas por neurônios dopaminérgicos na via mesolímbica (SHOHAMY E ADCOCK, 2010). A amígdala e o hipocampo são áreas primitivas de nosso cérebro e a própria evolução do SNC explicaria as suas participações no sistema recompensa, já que uma informação sobre o local exato onde um determinado animal conseguiu saciar sua sede

**Figura 4.** Sistema mesocorticolímbico ou sistema recompensa. Formado pela área tegumentar ventral (ATV); Complexo amígdala-hipocampo (Am-Hip); *Nucleus Accumbens* (NAc) e Córtex Pré-frontal (CPF).



**Fonte:** Adaptado de LEE et al., 2012

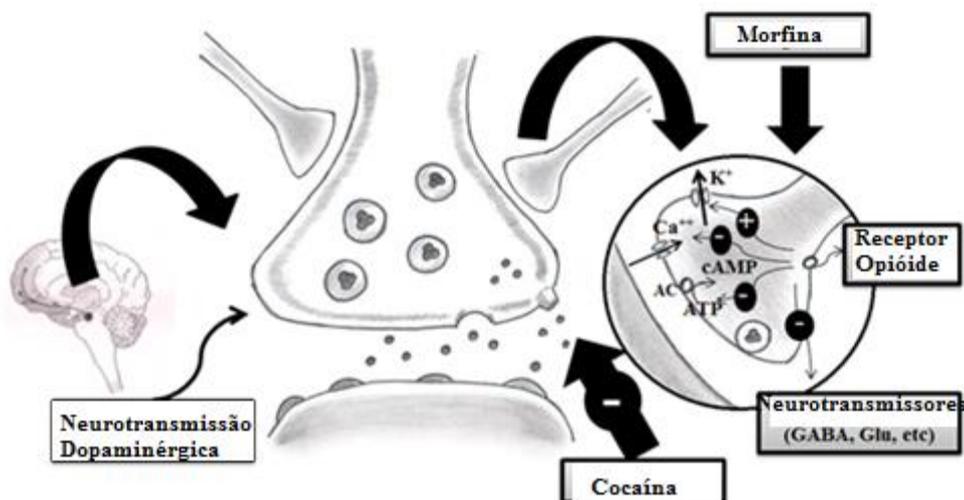
ou sua fome teria tamanha importância para a sua sobrevivência que deveria ser devidamente preservada, pois poderia ser necessário, em outra oportunidade, acessar, novamente, tal informação (LISMAN; GRACE, 2005; MIZUMORI; JO, 2013).

Uma terceira região é o CPF. Dentre todas as outras espécies conhecidas no planeta, os seres humanos possuem o CPF mais desenvolvido, provavelmente por ser a região de nosso cérebro onde os pensamentos mais complexos são capazes de serem formados como, por exemplo, o planejamento de um dia de trabalho, escrever uma ficção ou simplesmente eleger prioridades (KEIFLIN et al., 2013). Essa área também possui a função de filtrar e barrar o comportamento desencadeado pelas outras áreas como a agressividade oriunda da ativação da amígdala embora seja, em muitos casos (ex. estresse), “suprimido” deixando os comportamentos gerados pelas áreas primitivas mais evidentes (ex. luta/fuga) (GARAVAN E WEIERSTA, 2012; BARI; ROBBINS, 2013).

Drogas com potencial adictivo (ex. psicoestimulantes e os opiáceos) agem sobre as sinapses das áreas citadas. Entretanto, a cocaína e os opióides como a morfina, ativam o sistema recompensa de forma diferente. A cocaína inibe a recaptação de monoaminas como a DA, NA e 5HT, uma etapa de suma importância para a finalização da ação dos neurotransmissores na fenda sináptica (SILVA et al., 2010). Portanto, a quantidade dessas aminas estará aumentada nas fendas sinápticas potencializando seus efeitos (NESTLER, 2013; ZIMMERMAN, 2012) (**Figura 5**).

Já a morfina ativa o sistema recompensa ao ligar-se em receptores opioides do tipo  $\mu$ ,  $\delta$  e  $\kappa$  presentes em interneurônios (ex. GABAérgicos ou Glu) que modulam a transmissão dopaminérgica no ATV e NAc (KIM et al., 2016). Fisiologicamente, interneurônios, como os GABAérgicos, inibem a transmissão dopaminérgica funcionando como um “freio” sináptico. Ao se ligar nesses receptores a morfina suprime o efeito inibitório dos interneurônios, pois se acopla na proteína G ( $G_i/o$ ), inibe a enzima Adenilato ciclase (AC), os canais de cálcio e ativa os canais de potássio consequentemente hiperpolarizando a membrana do interneurônio. Como consequência ocorre um aumentando da quantidade de DA no NAc (TRAYNOR, 2012; KIM et al., 2016) (**Figura 5**).

**Figura 5.** Mecanismos dos alcaloides cocaína e morfina sobre a transmissão dopaminérgica no sistema recompensa.



**Fonte:** Arquivo pessoal (2017).

**Legenda:** ATP (trifosfato de adenosina), cAMP (monofosfato cíclico de adenosina), AC (adenilato ciclase),  $\text{Ca}^{++}$  (cálcio),  $\text{K}^+$  (potássio), GABA (ácido gama-amino-butírico) e Glu (glutamato).

As diferenças desses alcaloides sobre o sistema mesocorticolímbico não podem ser resumidas somente aos mecanismos de ação dessas substâncias, podendo ser observadas, também, nos aspectos comportamentais. A síndrome de abstinência resultante da interrupção do uso crônico de cocaína e morfina reflete bem isso. A abstinência à cocaína é caracterizada por depressão, ansiedade, agitação, paranoia e desejo intenso para consumi-la novamente, que pode durar até vários dias após a interrupção do seu uso (ZIMMERMAN, 2012). A abstinência por morfina leva ao desenvolvimento de sintomas físicos bastante aversivos o que não é visto com a cocaína (BRUIJNZEEL et al., 2004; O'BRIEN, 2005; SOLHI et al., 2013; MATINFAR et al., 2013).

A adicção a drogas é um desafio para pesquisadores e para uma melhor compreensão de seu mecanismo existem modelos capazes de simular aspectos importantes do desenvolvimento da síndrome adictiva. Os modelos são empregados na busca por um melhor entendimento dos efeitos de vários grupos de drogas como os psicoestimulantes, opióides, alucinógenos, canabinóides.

### 3.4 Modelos animais na pesquisa para adicção a drogas

A dependência é um dos fenômenos humanos que não podem ser reproduzidos em laboratório sem que haja restrições. No entanto, algumas das características comportamentais desta síndrome podem ser, satisfatoriamente, modeladas em laboratório. Desta forma, algumas técnicas foram desenvolvidas para simular aspectos dos comportamentos na busca pelo consumo dessas substâncias. O objetivo principal da pesquisa sobre a adicção as drogas é uma compreensão melhor dos mecanismos de dependência e sua influência no comportamento dos seres humanos. Portanto, nas duas últimas décadas, modelos animais têm sido propostos como uma tentativa de avaliar com maior verossimilhança os aspectos genuínos dos comportamentos de dependência (PLANETA, 2013). Os modelos de livre escolha com garrafas, preferência condicionada por lugar, de autoadministração de drogas e abstinência são alguns dos modelos mais utilizados e serão detalhados a seguir.

#### *Modelo de livre escolha com garrafas*

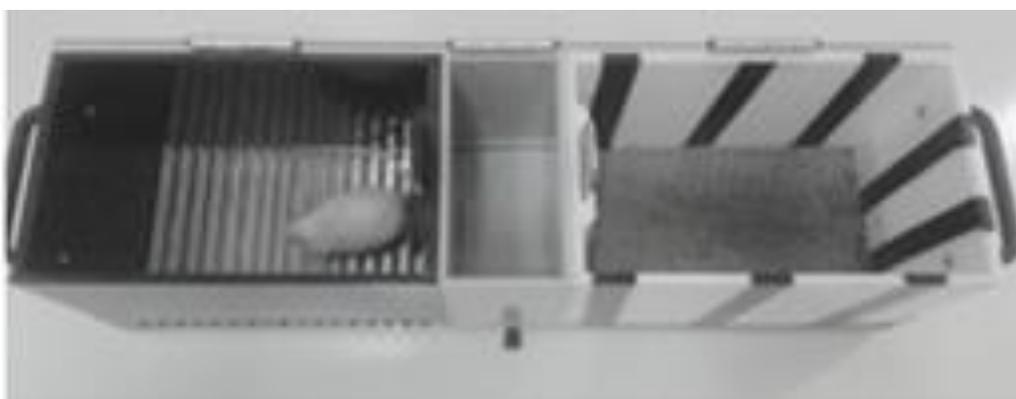
O modelo de livre escolha com garrafas é um método de autoadministração não operante restrito a administração oral e utilizado na pesquisa de adicção a drogas. Um exemplo da utilização desse método é a investigação de exposições de curto prazo ou de longo prazo ao álcool, assim como os mecanismos relacionados ao abuso do álcool e adicção. Richter e Campbell, (1940) foram os primeiros a relatar que ratos de laboratório consomem voluntariamente etanol. No modelo, os animais possuem livre acesso a duas garrafas, onde uma encontra-se preenchida por água e outra encontra-se o álcool diluído em água. A medição da ingestão de etanol é normalmente realizada pesando-se a garrafa de água e de etanol uma vez a cada 24 horas. A preferência por álcool é definida em termos de g de etanol/kg de peso corporal/dia e percentagem total de líquido consumido. Porém, o resultado depende não só da quantidade total de etanol consumido por um animal no período de 24 horas, mas também do tempo e padrão de consumo, medido respectivamente pela frequência de abordagens a uma solução de etanol e pela quantidade consumida (PLANETA, 2013).

#### *Preferência condicionada por lugar (PCL)*

No procedimento de PCL, os efeitos dos fármacos (ex. cocaína, morfina etc.) que se presume atuarem como um estímulo incondicionado (EI), são repetidamente pareados

com um estímulo neutro. Neste processo, de natureza Pavloviana, o estímulo neutro adquire capacidade de agir como um estímulo condicionador (EC). O método mais comum baseia-se na utilização de um ambiente como EC. O aparelho de teste consiste em caixas com três compartimentos distintos, separados por portas de guilhotina, que diferem em estímulos visuais e táteis. Por exemplo, os compartimentos podem diferir no revestimento, cor da parede, cheiro etc. Existe, também, um terceiro compartimento (neutro) ao qual não é pareado com o fármaco e serve como ponto de partida para o teste (**Figura 6**). Ao final, avalia-se o tempo de permanência do animal no compartimento pareado com a substância adictiva (LYNCH et al., 2010).

**Figura 6.** Exemplo do modelo Preferência Condicionada por Lugar (PCL).



**Fonte:** Arquivo pessoal (2017).

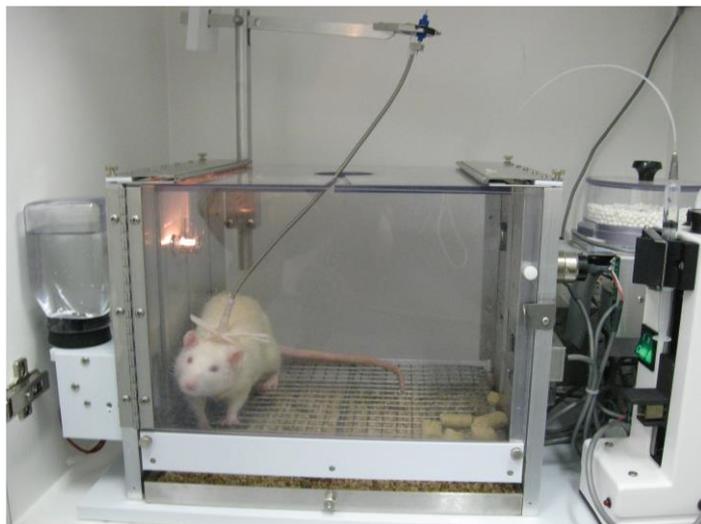
**Legenda:** O aparelho consiste em três compartimentos completamente diferentes em relação aos aspectos visuais e táteis.

#### *Modelo de autoadministração de drogas*

Apesar dos modelos citados acima serem modelos de boa correlação dos efeitos adictivos de drogas de abuso e o comportamento adictivo como o de busca (livre escolha por garrafas) e da influência de ambiente e memória adictiva (PCL), um viés importante é a capacidade de autoadministração da substância. O modelo de autoadministração baseia-se no conceito de reforço positivo e modulação de comportamento; ou seja, drogas reforçadoras positivas aumentam a probabilidade do comportamento que resulta na autoadministração dessas substâncias. Assim, a autoadministração é vista como uma resposta operante reforçada pelos efeitos da droga, e é um protocolo para o estudo da ingestão voluntária em animais (LYNCH et al., 2010).

No modelo, são implantados na veia jugular dos animais cateteres com saída pelo dorso. O cateter fica ligado a um sistema composto por uma bomba de injeção. O animal é condicionado a pressionar a alavanca para receber uma dose da substância adicta (**Figura 7**). Dessa forma, quanto maior é a capacidade adictiva da substância mais vezes o animal pode pressionar a barra para receber uma dose como recompensa. Pressupõe-se que os fármacos têm semelhanças com estímulos reforçadores naturais, como o sabor de alimentos adocicados estudado inicialmente por Skinner nos anos 30 e definido por ele como condicionamento operante. O condicionamento operante vem sendo aplicado como um modelo animal de toxicod dependência desde a década de 1960. Em 1962, Weeks descreveu a técnica de autoadministração intravenosa de morfina em ratos. Desde então, o modelo foi aplicado no estudo de heroína, cocaína, anfetamina, nicotina, etanol e delta-9-THC (LYNCH et al., 2010; PLANETA, 2013; WEEKS, 1962).

**Figura 7.** Câmara operante para autoadministração de droga intravenosa.



**Fonte:** LYNCH et al., 2010

### *Abstinência a drogas*

Num modelo típico de abstinência de fármacos, os animais são tratados cronicamente com um fármaco e abruptamente é realizado a interrupção do tratamento. Por exemplo, no caso de opióides, a interrupção do tratamento é realizada com administração de uma antagonista opioide (ex. naloxona ou naltrexona) e as frequências dos sinais de abstinência são observados e codificadas a partir de uma lista de verificação

que inclui comportamentos do tipo tremores de pata, ptose, agitação de cachorro molhado, andar em marcha ré, saltos, diarreia etc. Os modelos de abstinência demonstraram ser correlacionáveis com os sintomas de abstinência em humanos e, como tais, têm validade científica (LYNCH et al., 2010; PLANETA, 2013).

### **3.5 O GABA: Biossíntese, receptores e alvo farmacológico no tratamento da ansiedade e adicção**

Desde a idade antiga, o uso de bebidas alcoólicas, poções contendo láudano, drogas obtidas a partir do ópio e várias ervas, eram bastante empregados para reduzir a dor, a ansiedade e para promover o sono. Os primeiros agentes introduzidos especificamente como sedativo e conseqüentemente como hipnótico, foram os brometos, seguidos dos hidratos de cloro, *p*-aldeído, uretano e sulfonas, esses últimos surgindo antes da introdução do barbital, em 1903. Em seguida, o fenobarbital, em 1912. Contudo, com a descoberta acidental do Clordiazepóxido, primeiro BZD, inicia-se uma revolução no tratamento da ansiedade e psicoses (GONÇALVES, 2006).

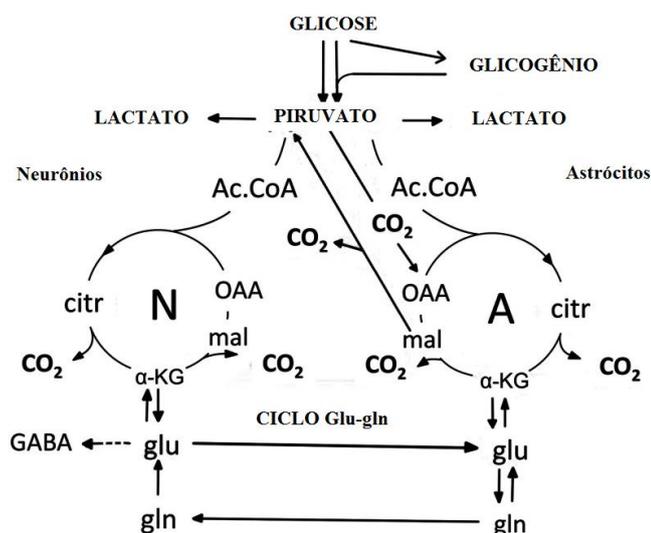
O Diazepam (DZP) é lançado em 1963, com o nome comercial de Valium® e traz um grande avanço na terapia da ansiedade sendo capaz de dissociar o efeito sedativo de suas propriedades ansiolíticas. Em pouco tempo o DZP passa a ser prescrito não somente para o tratamento da ansiedade, mas também para o tratamento da epilepsia, espasmos musculares e à abstinência ao álcool (CALCATERRA; BARROW, 2014). O DZP assim como os outros BDZs, atuam sobre os receptores GABA<sub>A</sub> (GABA<sub>AR</sub>). Essa classe de drogas modula alostericamente o GABA<sub>AR</sub> promovendo influxo de cloreto em células neuronais hiperpolarizando a membrana pós-sináptica. Como resultado, o GABA é potencializado no sistema límbico, tálamo, hipotálamo e no córtex cerebral produzindo efeito ansiolítico e antiepilético (CALCATERRA; BARROW, 2014).

O GABA é o principal neurotransmissor inibitório do SNC sendo sintetizado a partir do Glutamato (Glu). Nos neurônios, o Glu é convertido no neurotransmissor Glu e GABA. Porém, após a liberação, uma quantidade maior de Glu e uma quantidade considerável de GABA são recaptados aos astrócitos. Este ciclo é conhecido como GABA-Glu (**Figura 8**) (HERTZ, 2013).

Assim, em ambos os tipos de células, o metabolismo do piruvato via acetil coenzima A (acetil-CoA) leva à formação de citrato por condensação com oxaloacetato

pré-existente (OAA) no ácido tricarboxílico (TCA). A oxidação do citrato no ciclo de TCA inclui duas descarboxilações, o que leva a uma nova formação do oxaloacetato, pronto para retornar ao ciclo e à produção de grandes quantidades de energia (ATP). A carboxilação de piruvato cria uma nova molécula de oxaloacetato, que após condensação

**Figura 8.** Ciclo GABA-Glu em neurônios (N) e astrócitos (A).



**Fonte:** adaptado de HERTZ, 2013.

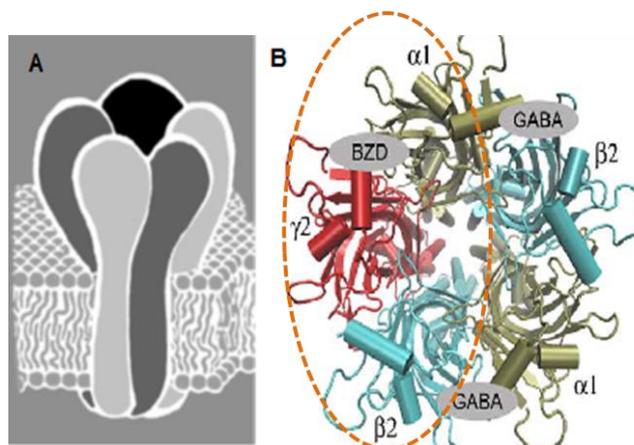
com a acetil Coenzima A derivada de uma segunda molécula de piruvato, forma uma nova molécula de citrato. O  $\alpha$ -cetogluturato ( $\alpha$ -KG), um dos intermediários do ciclo de TCA, pode deixar o ciclo e formar Glu. Catalisado pela enzima glutamina sintetase específica forma a glutamina (Gln). Após liberação dos astrócitos, a Gln é acumulada nos neurónios glutamatérgicos e GABAérgicos. A partir do ciclo Glu-gln, é convertida em Glu (e em células GABAérgicas em GABA) sendo liberado, então, como neurotransmissor. O Glu liberado é quase totalmente estocado novamente nos astrócitos, juntamente com parte do GABA anteriormente liberado e reestocado no citosol dos astrócitos. Portanto, cerca de 85% do que é convertido em glutamina reingressa no ciclo glutamina-glutamato (HERTZ, 2013; MÁRQUEZ et al., 2016).

O GABA é o alvo farmacológico não apenas dos BDZs, mas de outros grupos farmacológicos como os barbitúricos, anestésicos e anticonvulsivantes. O GABA exerce seu efeito via GABA<sub>A</sub>R e via receptores metabotrópicos GABA<sub>B</sub> (GABA<sub>B</sub>R) (OLSEN; SIEGHART, 2010). Os GABA<sub>A</sub>Rs estão envolvidos com um grande número de funções como a cognitiva, aprendizado e a memória. Assim como estão envolvidos com vários

distúrbios como ansiedade, esquizofrenia, distúrbios do sono, depressão e adicção. Os GABA<sub>A</sub>Rs pertencem à família dos receptores de alça-cis, juntamente com os receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChRs), o receptor do tipo 3 de serotonina (5-HT<sub>3</sub>Rs) e os receptores de Glicina (GliRs). Todos os receptores de alça-cis são conjuntos homoméricos ou heteroméricos de cinco subunidades que formam um poro central de condução iônica (**Figura 9**) (BERGMANN et al., 2013). Portanto, o receptor é formado por duas subunidades  $\alpha$ 1, duas subunidades  $\beta$ 2 e uma subunidade  $\gamma$ 2 (MILLER; ARICESCU, 2015).

Os GABA<sub>A</sub>R estão envolvidos com vários distúrbios do SNC como a ansiedade e depressão. (**Figura 9 A**) Ilustração lateral do GABA<sub>A</sub>R e suas cinco subunidades formando um poro iônico central. (**Figura 9 B**) Modelagem molecular do GABA<sub>A</sub>R. Em verde as duas subunidades  $\alpha$ 1, em azul as duas subunidades  $\beta$ 2 e em vermelho a subunidade  $\gamma$ 2. No detalhe (elipse com linha tracejada laranja) o local onde os benzodiazepínicos (BZDs) se ligam ao receptor nas subunidades  $\gamma$ 2/ $\alpha$ 1.

**Figura 9.** Figuras ilustrativas dos receptores GABA<sub>A</sub> (GABA<sub>A</sub>Rs)



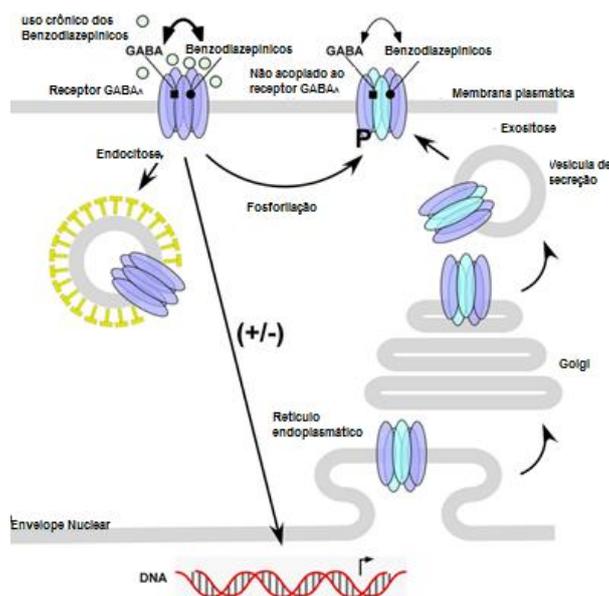
**Fonte:** adaptado de OLSEN; SIEGHART, 2010 e BERGMANN et al., 2013.

Atualmente, ferramentas computacionais como a modelagem molecular são utilizadas para uma melhor compreensão do mecanismo de ação de fármacos de diversos grupos terapêuticos assim como os ansiolíticos. Por exemplo, através de estudos de docagem foi possível determinar a ligação dos BDZs, nas subunidades  $\gamma$ 2/ $\alpha$ 1 do GABA<sub>A</sub>R. Segundo esses estudos o DZP acopla-se nos aminoácidos Lis105, Tir160, Tir210 e Val212 na subunidade  $\alpha$ 1 e ao aminoácido Fen77 na subunidade  $\gamma$ 2 (CI; REN; SU, 2008).

Estudos indicam que os BDZs não só aumentam a afinidade do GABA com os GABA<sub>A</sub>Rs mas podem, também, influenciar diretamente o GABA<sub>A</sub>R e agir aumentando de forma parcial a eficácia do GABA ao GABA<sub>A</sub>R. Assim, à longo prazo a ativação do receptor GABA<sub>A</sub>R provoca alterações em estruturas nos tecidos neuronais como as áreas mesolímbicas. Essas alterações adaptativas (neuroplasticidade) podem ser responsáveis pelos principais efeitos adversos dos BZDs como a tolerância e a dependência. Por isso, a interrupção abrupta do tratamento à longo prazo com os BDZs produz uma síndrome de abstinência, considerada um sinal de dependência, caracterizada por aumento da ansiedade, insônia e distúrbios sensoriais ocorrendo 1 ou 2 semanas após a descontinuidade do uso da droga. Como os efeitos dos BDZs são opostos aos da retirada é possível que os efeitos sejam resultantes de mecanismos compensatórios. No entanto, a dependência pode ocorrer na ausência de tolerância e a tolerância pode desenvolver-se sem qualquer manifestação de dependência (GRAVIELLE, 2015).

A tolerância parece ser causada pela diminuição gradual da expressão de GABA<sub>A</sub>R na superfície da célula. A força do GABA<sub>A</sub>R no processo da neurotransmissão inibitória depende muito do equilíbrio do ciclo contínuo de internalização e expressão de novos receptores. Esse ciclo é controlado pela interação de diferentes proteínas com subunidades do receptor (**Figura 10**) (GRAVIELLE, 2015).

**Figura 10.** Efeito da administração crônica de BDZs em GABA<sub>A</sub>R.

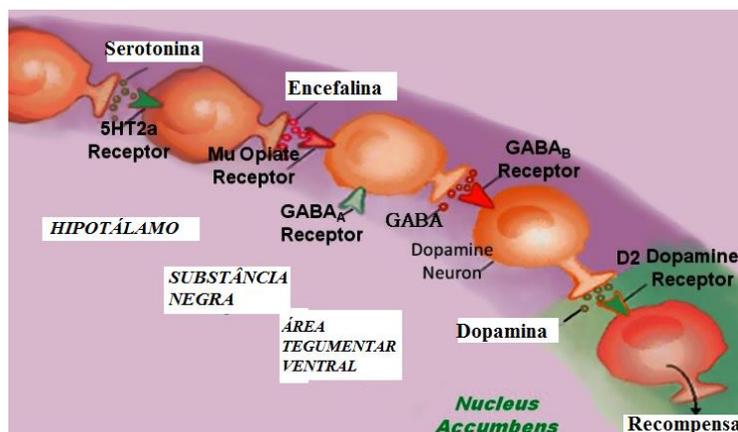


**Fonte:** adaptado de GRAVIELLE, 2015

Os BDZs ainda são as principais drogas utilizadas no tratamento da ansiedade. Porém, o fato dessas substâncias produzirem tolerância e dependência, justifica por si só a busca por novas moléculas com menos efeitos adversos. E apesar de poder causar dependência os BDZs podem interferir no desenvolvimento do modelo de PCI por opióides (SUZUKI et al., 1995) e psicoestimulantes (cocaína e ou anfetamina) (MERIRINNE et al., 1999).

O GABA é um neurotransmissor importante no desenvolvimento da adicção a drogas. A cascata bioquímica que ativa o sistema recompensa inicia-se na ATV e finaliza com a liberação de DA em receptores D2 localizados na membrana celular do hipocampo e NAc (CHEN; HOPF; BONCI, 2010). Em resumo, a cascata é desencadeada a partir da atividade excitatória da 5-HT que provoca a liberação do peptídeo opioide endógeno a meta-enkefalina. A meta-enkefalina, por sua vez, ao se ligar aos receptores  $\mu$ , regula os neurônios responsáveis pela liberação de GABA, reduzindo sua atividade. A função do GABA é inibir a liberação de DA (**Figura 11**). Quando os neurônios contendo DA na ATV e de certas partes do hipocampo e da amígdala são desinibidos, a DA é liberada no NAc, o que resulta em sensação de prazer e a conclusão da cascata (BLUM et al., 2014).

**Figura 11.** Participação do ácido gama-amino-butírico (GABA) na cascata bioquímica do sistema recompensa.



**Fonte:** adaptado de BLUM et al., 2014.

Portanto, a exemplo do DZP, novas moléculas com efeito sobre o GABA podem desempenhar importante papel no tratamento da ansiedade e no desenvolvimento da adicção a drogas.

### 3.6 Monoterpenos como alternativa terapêutica e os efeitos centrais do (+) e (-) - Borneol

A natureza há muito tempo é utilizada como fonte de drogas para a cura das mazelas humanas. Por exemplo, o uso do ópio, extraído da *Papaver somniferum*, no tratamento da dor remonta de períodos muito antigos talvez até pré-históricos. Sementes e cápsulas de papoula foram encontradas em uma vila na Suíça, utilizadas em um período provavelmente neolítico da humanidade e em uma tumba Egípcia do século XV a.C. foram encontrados resquícios do uso de ópio (DUARTE, 2005).

O ópio é apenas um dos exemplos que podemos citar sobre a contribuição dos produtos naturais na evolução dos tratamentos farmacológicos de diversas patologias. Do próprio ópio é extraído alcaloides como a morfina, codeína e papaverina, utilizados respectivamente como analgésico, antitussígeno e espasmolítico. O ácido acetil-salicílico (AAS), medicamento atualmente obtido através de síntese, foi inicialmente produzido a partir do ácido salicílico extraído da casca do salgueiro. A penicilina a partir do metabolismo de fungos do gênero *Penicillium*. A reserpina obtida a partir da *Rauwolfia serpentina* e mais recentemente fitoterápicos como o *Ginkgo biloba* utilizado no controle de problemas vasculares cerebrais, na memória e com propriedades neuroprotetoras (VIEGAS; DA SILVA BOLZANI; BARREIRO, 2006). Contudo, é importante ressaltar que a cada 1000 princípios ativos de potencial terapêutico, apenas 1 torna-se um fármaco (RAYOL; SANDES; BLASI, 1999).

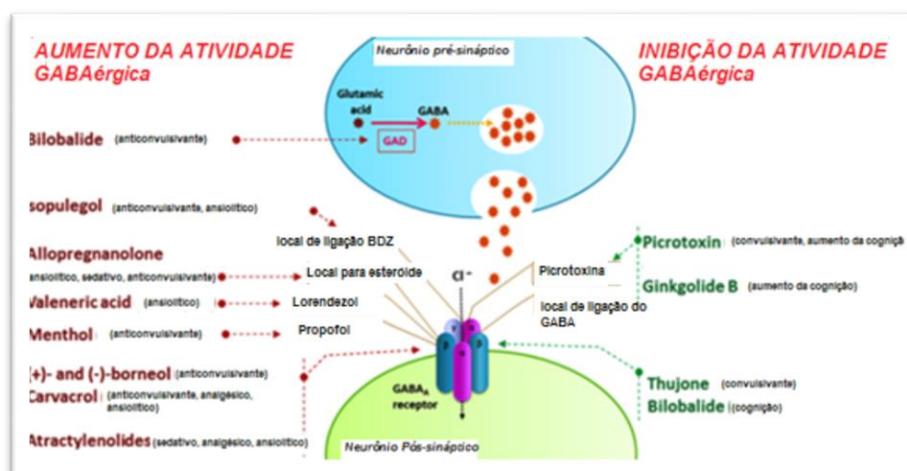
O Brasil possui uma grande diversidade de plantas medicinais, representando uma importante fonte para estudos farmacológicos e conseqüentemente para a descoberta de novos medicamentos (BARREIRO; BOLZANI, 2009). As plantas contêm inúmeros constituintes e seus extratos, quando testados, podem apresentar efeitos sinérgicos entre os diferentes princípios ativos em virtude da presença de compostos de classes ou estruturas diferentes. As principais classes de constituintes químicos de plantas são: ácidos graxos, terpenóides, esteróides, fenóis, alcalóides, cumarinas e flavonóides (MACIEL et al., 2002).

Os terpenos constituem o grupo mais abundante e estruturalmente mais diversificado de metabólitos secundários de plantas (ZWENGER; BASU, 2008). Eles possuem uma ampla variedade de funções biológicas e a maioria possui propriedade

medicinal. São normalmente produzidos em tecidos vegetais, flores e raízes (CHENG et al., 2007). Podem ser classificados de acordo com o número de carbonos utilizados na biossíntese de sua estrutura em monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos, carotenóides, entre outros. Os compostos terpênicos mais frequentes são os monoterpenos (90%) e os sesquiterpenos (CHENG et al., 2007).

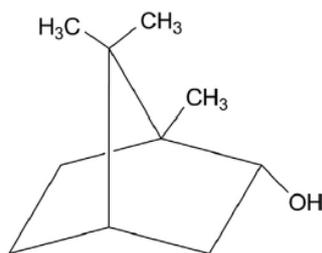
Os monoterpenos, devido ao seu baixo peso molecular, costumam ser substâncias voláteis, sendo, portanto, denominados óleos essenciais ou essências. Monoterpenos como Carvacrol, Mentol, Limoneno, Timol e Borneol são um grupo de compostos naturais derivados de duas unidades de isopreno. Todos esses monoterpenos modulam, de alguma forma, o GABA<sub>A</sub>R (**Figura 12**). Ao Mentol, Isopulegol, Cavacrol, (+) e (-) - Borneol é atribuído atividade anticonvulsivante. Ao Isopulegol, Alopregnonona, Ácido valérico e Carvacrol é atribuída atividade ansiolítica (MANAYI et al., 2016).

**Figura 12.** Terpenos com atividade sobre os GABA<sub>A</sub>Rs e seus respectivos efeitos anticonvulsivantes e ansiolíticos.



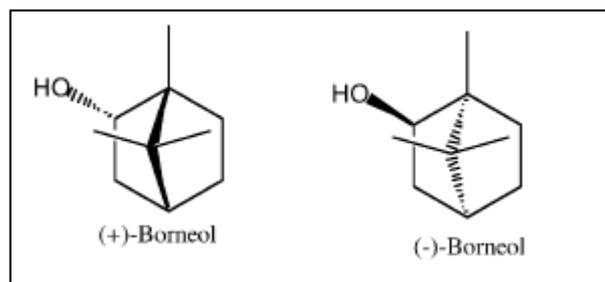
**Fonte:** adaptado de MANAYI et al., 2016

O Borneol (**Figura 13**) está presente nos óleos essenciais de várias plantas medicinais, incluindo *Blumea balsamifera* L., *Gardenia jasminoides* J. Ellis (XU et al., 2014) e *Dryobalanops aromatica* Gaertn (KONG et al., 2014). Pesquisas sobre seu potencial terapêutico tem demonstrado atividade periférica como, por exemplo, efeito cardiovascular (SILVA-FILHO et al., 2011; WANG et al., 2006), antinociceptivo (JIANG et al., 2015; SHERKHELI et al., 2015) e anti-inflamatório (ALMEIDA et al., 2013).

**Figura 13.** Estrutura química do Borneol**Fonte:** CHEN et al., 2014

Uma das características desse monoterpene sobre o SNC, é o fato do mesmo aumentar a permeabilidade da Barreira Hematoencefálica (BHC) (DUAN et al., 2016). Essa propriedade tem sido utilizada com o intuito de melhorar a distribuição de fármacos (YAN-YU; QI-NENG; ZHI-PENG, 2007; ZHANG et al., 2015), uma importante característica quando se trata do seu potencial farmacológico e farmacotécnico.

O Borneol é um álcool de baixo peso molecular (154.253 g/mol) com densidade de 1,011 g/cm<sup>3</sup> à 20 °C e ponto de fusão igual a 208 °C, com grande aplicação nas indústrias alimentícia, cosmética e farmacêutica. Em geral, pode ser encontrado na natureza ou ser sintetizado em laboratório (Borneol sintético [BS]). O BS apresenta-se como uma mistura racêmica formada pelo (+) - Borneol e (-) - Borneol (**Figura 14**). Já no Borneol natural, encontramos o isômero (+) - Borneol (CHEN et al., 2014).

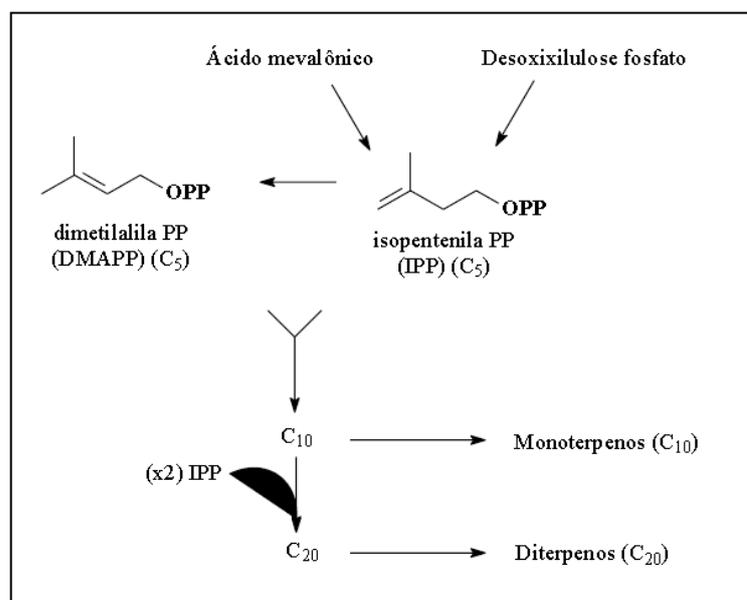
**Figura 14.** Estrutura química do (+) e (-) - Borneol**Fonte:** CHEN et al., 2014

Na natureza o Borneol provém da biossíntese dos terpenos que pode ocorrer a partir de duas vias, a via do mevalonato ou através da via do fosfato de metileritritol. A partir da via do mevalonato, que ocorre no citosol e está presente em todos os organismos, são

sintetizados sesquiterpenos, triterpenos e esteroides. Na via do metileritritol, que ocorre nos cloroplastos e outros plastídeos, presente em algumas bactérias, algas e plantas, são sintetizados monoterpenos, diterpenos e carotenoides (BOHLMANN; MEYER-GAUEN; CROTEAU, 1998).

Durante o processo de biossíntese, os monoterpenos são formados a partir da união de duas unidades de isopreno ( $C_5$ )<sub>2</sub> que, de forma resumida, possuem como ponto de partida a adição de dois precursores, o primeiro é o ácido Mevalônico (precursor da síntese de colesterol em animais) e o segundo é o 1-Desoxi-Dexilulose 5-fosfato (DXP). O processo de biossíntese ocorre com a combinação do dimetilalil difosfato (DMAPP) e o isopentenil difosfato (IPP) via enzima prenil transferase, gerando Geranyl difosfato (GPP) e com uma unidade a mais de isopreno o Farnesil difosfato (FDP). Com o acréscimo de IPP e dimerização outras classes de terpenos são formadas (**Figura 15**).

**Figura 15.** Biossíntese dos monoterpenos e diterpenos.



**Fonte:** Adaptado de SAITO; SADOSHIMA, 2016.

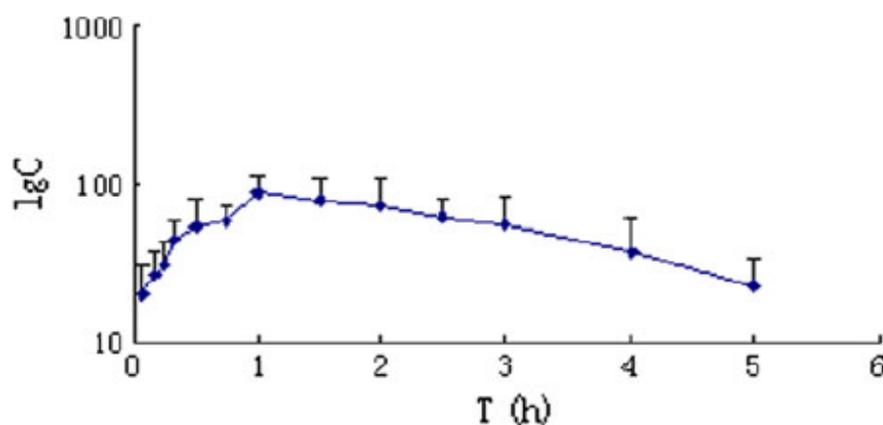
A variedade dos monoterpenos é consideravelmente ampliada, por reações conhecidas como ciclizações. Com as reações de ciclização surgem diversos tipos de moléculas cíclicas. Por esse caminho é que moléculas monocíclicas ou bicíclicas como, por exemplo, limoneno,  $\alpha$ -terpineol, 1,8-cineol e o próprio Borneol são formadas (BOHLMANN; MEYER-GAUEN; CROTEAU, 1998; PAUL, 2002).

Esse processo biossintético ocorre em diversas plantas como por exemplo, *Valeriana officinalis* L. (Valerianaceae), *Matricaria chamomilla* L. (Asteraceae) e *Lavandula officinalis* Chaix & Kitt. (Lamiaceae) utilizadas tradicionalmente para aliviar sintomas de ansiedade, cansaço, insônia e dor (PASSOS et al., 2009).

Existem poucos trabalhos que abordam a farmacocinética do Borneol. Alguns desses, comparam as vias oral, intravenosa e intranasal (ZHAO et al., 2012), assim como, sua distribuição no cérebro e plasma (LI et al., 2012). Logo, em relação à concentração, após administração intravenosa, o Borneol apresenta-se em maior quantidade no sangue e no cérebro. Ao comparar as biodisponibilidades relativas de administrações nasal e oral, a administração nasal corresponderia a 2/5 da intravenosa, enquanto que a oral corresponde somente a 1/5 (LI et al., 2012).

Por ser uma molécula pequena e lipídica, após sua administração oral, em 5 minutos o Borneol atinge o SNC e o pico máximo de concentração é alcançado em torno de 60 minutos. Existem diferenças na farmacocinética do BS em espécies de roedores. A meia-vida do BS é menor em camundongos (1,66 horas) do que em ratos (3,8 horas) (ZHAO et al., 2012). Contudo, assim como é rápido o aumento da sua concentração no SNC, sua eliminação também o é (**Figura 16**) (LI et al., 2012).

**Figura 16.** Tempo médio da concentração de Borneol natural no cérebro de camundongos após uma única dose de 1,2 g/kg, por via oral.

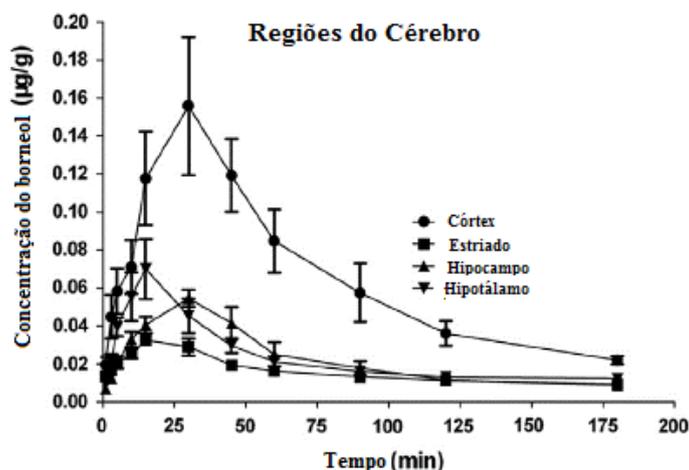


Fonte: LI et al., 2012

BS distribui-se bem no SNC, alcançando áreas subcorticais como hipocampo, hipotálamo e corpo estriado além de áreas corticais. Existem diferenças na concentração

do Borneol por região do cérebro. Por exemplo, é possível observar uma maior concentração e uma menor concentração de Borneol no córtex e no corpo estriado, respectivamente (**Figura 17**) (YU et al., 2013). Abaixo discorreremos sobre alguns efeitos centrais do Borneol.

**Figura 17.** Curva de concentração do Borneol no cérebro de ratos.



**Fonte:** YU et al., 2013

### *Efeito sobre a BHC*

A BHC é uma membrana altamente seletiva que controla a passagem de substâncias entre o sangue e o cérebro. O transporte seletivo facilita a absorção de íons, aminoácidos, glicose e outros nutrientes atendendo a demanda de energia do cérebro (PARDRIDGE, 2005; PULICHERLA; VERMA, 2015). Proteínas como as P-glicoproteína (P-gp), proteínas associadas à resistência a múltiplas drogas (PRM) e as proteínas de resistência ao câncer de mama (Bcrp) agem modulando a entrada de muitos fármacos. Drogas com efeitos moduladores sobre essas proteínas podem ser úteis no tratamento de muitas doenças do SNC, ao facilitar a passagem através da BHC (YU et al., 2013). Como o Borneol consegue aumentar a permeabilidade da BHC, essa molécula tem sido utilizada como adjuvante de drogas que fracassam no processo de transposição da BHC. O Borneol facilita a passagem de drogas que podem ser úteis no tratamento de patologias como encefalite (REN et al., 2013), doenças vasculares cerebrais (YAN-YU; QI-NENG; ZHI-PENG, 2007) ou pode agir sinergicamente com esses fármacos melhorando seus resultados terapêuticos (CHEN et al., 2013).

O Borneol diminui a atividade de P-gp em células endoteliais microvasculares via NF- $\kappa$ B (FAN et al., 2015) e é capaz de aumentar a permeabilidade das zonas de oclusão e de proteínas como as Mdr1a, Mdr1b e Mrp1 (YU et al., 2013). Assim, como o Borneol distribui-se em regiões como o hipocampo, hipotálamo, corpo estriado e córtex, o mesmo pode ser utilizado em conjunto com drogas que possuem alvos terapêuticos nessas regiões (YU et al., 2013). Na realidade, essa molécula já vem sendo utilizado com esse propósito (YAN-YU; QI-NENG; ZHI-PENG, 2007; ZHANG et al., 2015).

Além dos efeitos sobre as proteínas, LI e colaboradores (2012) propõem que o aumento da permeabilidade provocada pelo Borneol seja decorrente de alterações na concentração no cérebro de amins bioativas como a 5-HT e histamina. Neurotransmissores como a 5-HT não são os únicos a sofrerem alteração na sua concentração, outros neurotransmissores também sofrem alterações de concentração como a Glu e Aspartato (Asp) (LI et al., 2012).

#### *Efeito antinociceptivo*

Na literature, é descrito atividade antinociceptiva do Borneol em modelos clássicos como o de placa quente e o teste de formalina. Em ambos o Borneol reduz o comportamento nociceptivo de forma significativa (ALMEIDA et al., 2013). Além disso, o (+) - Borneol produz efeito antinociceptivo em modelos de dor crônica desencadeado pelo modelo de ligação de nervo da medula espinhal ao ativar receptores GABA<sub>A</sub> (JIANG et al., 2015). A sensibilização central, via medula espinhal, é importante na manutenção da dor crônica. A perda do processo inibitório mediado por GABA contribui para hiperalgesia (JIANG et al., 2015). Vale ressaltar que o Borneol não é o único monoterpeno que age sobre receptores GABA<sub>A</sub>, outros terpenos também possuem essa atividade (HALL et al., 2004; MANAYI et al., 2016).

Outro mecanismo antinociceptivo do Borneol faz referência à inibição do receptor potencial transitório vanilóide tipo I (TRPA1) e à redução do influxo de Ca<sup>2+</sup>. O TRPA1 pertence a uma grande família de proteínas de canais catiônicos sendo expressos em células neuronais e não neuronais. Sua função sobre a permeabilidade de Ca<sup>2+</sup>, de forma não seletiva, ocorre em vários processos celulares incluindo a dor crônica neuropática (AKOPIAN et al., 2007; JAQUEMAR; SCHENKER; TRUEB, 1999). Em receptores TRPA1 expressos em *Xenopus oocytes*, os dois isômeros (-) e (+) - Borneol interferem

na corrente de  $\text{Ca}^{2+}$  em baixa (100  $\mu\text{M}$ ) e alta (1 mM) concentração de óleo de mostarda como também inibe a corrente de  $\text{Ca}^{2+}$  em receptores de TRPA1 expressos em cultura de célula humana HEK293T (SHERKHELI et al., 2015; TAKAISHI et al., 2014).

#### *Atividade Ansiolítica (ação sobre o GABA)*

De forma geral, atividade de terpenos sobre receptores GABA é largamente relatada na literatura (GARLET et al., 2016; JEON et al., 2015; MANAYI et al., 2016) a ponto de servirem como “moléculas modelo” na síntese de novos fármacos ansiolíticos (NESTERKINA; KRAVCHENKO, 2016).

Alguns efeitos do Borneol sobre GABA já foram relatados. Tanto o (+) - Borneol quanto (-) - Borneol exibiram efeitos positivos sobre receptores recombinantes humanos  $\alpha 1\beta 2\gamma_{2L}$  GABA<sub>A</sub>. O (-) - Borneol inibe a atividade GABA quando este é administrado em sua máxima concentração (100  $\mu\text{M}$ ) demonstrando um perfil de agonista parcial (GRANGER; CAMPBELL; JOHNSTON, 2005). Já o (+) - Borneol apresenta uma resposta GABA estatisticamente semelhante aos indutores anestésicos como barbitúricos, etomidato e propofol. Porém, por ser insensível aos efeitos do flumazenil o monoterpene parece agir sobre sítios diferentes dos BDZs (GRANGER; CAMPBELL; JOHNSTON, 2005).

Em outro estudo o (-) - Borneol reduziu as convulsões induzidas por pentilenotetrazol, uma droga que antagoniza os efeitos pós-sinápticos do GABA alterando o influx de cloreto (QUINTANS-JÚNIOR et al., 2010). De forma geral, o (-) - Borneol e o (+) - Borneol apresentam diferentes padrões de modulação de receptores GABA onde o (-) - Borneol age como um agonista parcial e o (+) - Borneol como um modulador positivo em baixa (1-4  $\mu\text{M}$ ) e alta (100  $\mu\text{M}$ ) concentração de GABA (GRANGER; CAMPBELL; JOHNSTON, 2005).

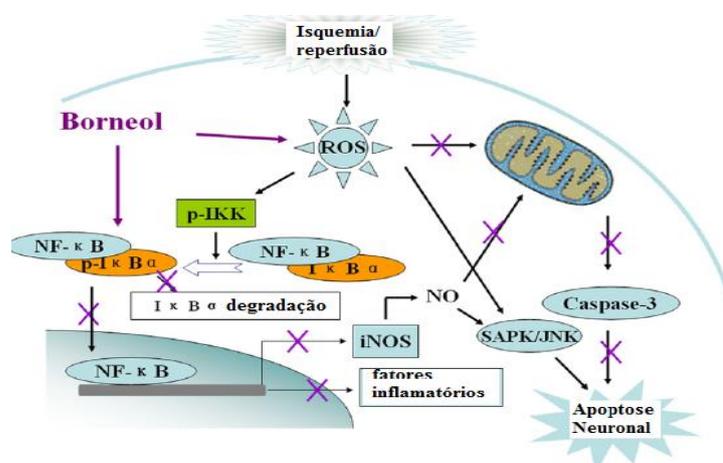
#### *Atividade neuroprotetora*

O metabolismo dos seres vivos necessita de oxigênio para sobreviver, porém o excesso de oxigênio (hiperoxia) produz toxicidade ou neurotoxicidade (CHAVKO; AUKER; MCCARRON, 2003). Espécies reativas de oxigênio (ROS) são responsáveis por patologias neurodegenerativas como doença de Parkinson (GREENE, 2014) e Alzheimer (ISLAM, 2016). Geralmente, a neurodegeneração consiste no aumento do dano oxidativo, da disfunção mitocondrial, acumulação de agregados proteicos oxidados,

inflamação e defeitos na eliminação de proteínas, culminando com a morte celular (HALLIWELL, 2006). Reduzir ou inibir a produção de ROS é um dos objetivos de busca por novos fármacos que possam ser utilizados no tratamento de doenças neurodegenerativas.

Um importante efeito atribuído ao Borneol é sua atividade neuroprotetora. O Borneol, em modelo de isquemia por reperfusão reduz o dano neuronal provocado pelo bloqueio do fluxo sanguíneo após ligação bilateral em artérias carótidas de ratos (KONG et al., 2014). Um estudo molecular em cultura primária de córtex de ratos recém-nascidos, foi realizado para avaliar o mecanismo de ação do Borneol. O efeito parece ser multifatorial, pois reduz a injúria neuronal, a condensação nuclear e a geração de ROS intracelular. Soma-se a isso, a capacidade do Borneol em inibir caspase. Caspases são enzimas responsáveis por iniciar processo de apoptose celular (morte programada da célula) o que diferencia o processo de outro tipo de processo de morte celular como a necrose (**Figura 18**) (LIU et al., 2011).

**Figura 18.** Proposta de mecanismo de neuroproteção mediado pelo Borneol



**Fonte:** Adaptado de LIU et al., 2011

### Neurotoxicidade

Li e colaboradores (2012) avaliaram a influência do Borneol sobre neurotransmissores excitatórios e inibitórios no SNC. Para isso, utilizaram uma fórmula que relaciona a concentração de neurotransmissores excitatórios como o Asp e o Glu, e inibitório como a Glicina (Gli) e GABA:

$$\text{Razão de excitação} = (\text{Asp} + \text{Glu}) / (\text{Gli} + \text{GABA})$$

O estudo demonstrou que o Borneol natural possui uma razão de excitação em torno de 20,30 obtido a partir de uma concentração no cérebro de camundongo de 86,52  $\mu\text{g/g}$ , e após uma única administração oral. Portanto, o Borneol influencia diretamente as concentrações de neurotransmissores no SNC, aumentando a concentração de Asp e GABA, excitatório e inibitório, respectivamente e reduzindo a concentração do neurotransmissor excitatório Glu. Um efeito “curioso” e que pode ser útil na compreensão de doenças que resultam de alterações nas concentrações desses mesmos neurotransmissores no SNC. Esse resultado pode ser considerado como um efeito adverso do Borneol e as consequências ainda necessitam de investigação mais aprofundada (LI et al., 2012).

Portanto, com base nas propriedades farmacológicas relatadas na literatura decidimos investigar os efeitos do (-) - Borneol sintético em modelos animais de ansiedade e em modelos de adicção, abstinência e neurotoxicidade à morfina, assim como avaliar seu potencial genotóxico em sangue periférico de camundongos.

## REFERÊNCIAS

AKOPIAN, A. N.; RUPAREL, N. B.; JESKE, N. A.; HARGREAVES, K. M. Transient receptor potential TRPA1 channel desensitization in sensory neurons is agonist dependent and regulated by TRPV1-directed internalization. **The Journal of physiology**, v. 583, n. Pt 1, p. 175–93, 2007.

ALMEIDA, J. R.; SOUZA, G. R.; SILVA, J. C.; SARAIVA, S. R.; JÚNIOR, R. G.; QUINTANS, J. DE S.; BARRETO, R. DE S.; BONJARDIM, L. R.; CAVALCANTI, S. C.; QUINTANS, L. J. Jr. Borneol, a bicyclic monoterpene alcohol, reduces nociceptive behavior and inflammatory response in Mice. **The Scientific World Journal**, v. 2013, 2013.

ANDREATINI, R.; BOERNGEN-LACERDA, R.; FILHO, D. Z. Tratamento farmacológico do transtorno de ansiedade generalizada: Perspectivas futuras. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 23, n. 4, p. 233–242, 2001.

ARCHER, J. Tests for emotionality in rats and mice. A review. **Animal Behaviour**, v. 21, p. 205-35, 1973.

BANDELOW, B.; MICHAELIS, S. Epidemiology of anxiety disorders in the 21st century. **Dialogues in Clinical Neuroscience**, v. 17, n. 3, p. 327–335, 2015.

BARI, A.; ROBBINS, T. W. Inhibition and impulsivity: behavioral and neural basis of response control. **Progress in Neurobiology**, v. 108, 44-79, 2013.

BARREIRO, E. J.; BOLZANI, V. D. S. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de farmacos. **Quimica Nova**, v. 32, n. 3, p. 679–688, 2009.

BERGMANN, R.; KONGSBK, K.; SØRENSEN, P. L.; SANDER, T.; BALLE, T. Unified Model of the GABAA Receptor Comprising Agonist and Benzodiazepine Binding Sites. **PLoS ONE**, v. 8, n. 1, 2013.

BLACKWELDER, R.; BRAGG, S. Anxiety disorders: A blended treatment approach. **The International Journal of Psychiatry in Medicine**, 2016.

BLUM, K.; OSCAR-BERMAN, M.; DEMETROVICS, Z.; BARH, D.; GOLD, M.S. Genetic Addiction Risk Score (GARS): Molecular Neurogenetic Evidence for Predisposition to Reward Deficiency Syndrome (RDS). **Molecular Neurobiology**, v. 50, n. 3, p. 765–796, 2014.

BOHLMANN, J.; MEYER-GAUEN, G.; CROTEAU, R. Plant terpenoid synthases: molecular biology and phylogenetic analysis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, n. 8, p. 4126–4133, 1998.

BOURIN, M. Animal models for screening anxiolytic-like drugs: A perspective. **Dialogues in Clinical Neuroscience**, v. 17, n. 3, p. 295–303, 2015.

BRUIJNZEEL, A. W.; REPETTO, M.; GOLD, M. S. Neurobiological mechanisms in addictive and psychiatric disorders. **Psychiatric Clinics of North America**. v. 27, n. 4, p. 661-674, 2004.

CALCATERRA, N. E.; BARROW, J. C. Classics in Chemical Neuroscience: Diazepam

- (Valium). **ACS Chemical Neuroscience**, v. 5, n. 4, p. 253–260, 2014.
- CASTILLOA, A. R. G.L.; RECONDOB, R.; ASBAHRC, F. R.; GISELE, G. **Revista Brasileira de Psiquiatria (Supl II)**, v. 22, n. m, p. 22–25, 2000.
- CHAVKO, M.; AUKER, C. R.; MCCARRON, R. M. Relationship between protein nitration and oxidation and development of hyperoxic seizures. **Nitric Oxide - Biology and Chemistry**, v. 9, n. 1, p. 18–23, 2003.
- CHEN, J; LI, L; SU, J; LI, B; CHEN, T; Wong, Y. S. Synergistic apoptosis-inducing effects on A375 human melanoma cells of natural borneol and curcumin. **PLoS ONE**, v. 9, n. 6, 2014.
- CHEN, Z. Z.; LU, Y.; DU, S. Y.; SHANG, K. X.; CAI, C. B. Influence of borneol and muscone on geniposide transport through MDCK and MDCK-MDR1 cells as blood-brain barrier in vitro model. **International journal of pharmaceutics**, v. 456, n. 1, p. 1–7, 2013.
- CHEN, B. T.; HOPF, F. W.; BONCI, A. Synaptic plasticity in the mesolimbic system. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1187, p. 129–139, 2010.
- CHENG, A.; LOU, Y.; MAO, Y.; LU, S.; WANG, L.; YA, X. Chen Plant terpenoids: Biosynthesis and ecological functions. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 49, n. 2, p. 179–186, 2007.
- CHOLERIS, E. A detailed ethological analysis of the mouse open field test: effects of diazepam, chlordiazepoxide and an extremely low frequency pulsed magnetic field. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 25, n. 3, p. 235–260, 2001.
- CI, S.; REN, T.; SU, Z. Investigating the putative binding-mode of GABA and diazepam within GABAA receptor using molecular modeling. **Protein Journal**, v. 27, n. 2, p. 71–78, 2008.
- COLLA, A. R.; ROSA, J. M.; CUNHA, M. P.; RODRIGUES, A. L. Anxiolytic-like effects of ursolic acid in mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 758, p. 171–176, 2015.
- COSTA, S. C.; DE GRAUWE, P. The cocaine and heroin markets in the era of globalisation and drug reduction policies. **International Journal of Drug Policy**. v. 20, n.6, p. 488-496, 2009
- DN STEPHENS, SL KING, JJ LAMBERT, D. BELELLI, AND T. D. GABAA Receptor Subtype Involvement in Addictive Behaviour. **Global Strategy Journal**, v. 0, n. 0, 2016.
- DOUKKALI, Z. et al. Evaluation of anxiolytic activity of methanolic extract of *Urtica urens* in a mice model. **Behavioral and brain functions : BBF**, v. 11, n. 1, p. 19, 2015.
- DUAN, M.; XING, Y.; GUO, J.; CHEN, H.; ZHANG, R. Borneol increases blood–tumour barrier permeability by regulating the expression levels of tight junction-associated proteins. **Pharmaceutical Biology**, v. 209, n. August, p. 1–10, 2016.
- DUARTE, D. F. Uma breve história do ópio e dos opióides. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 55, n. 1, p. 135–146, 2005.

KORPI, E.R. et al. Mechanisms of action and persistent neuroplasticity by drugs of abuse. **Pharmacological Reviews**, v. 67, n. 4, p. 872–1004, 2015.

ENNACEUR A, C. P. Preclinical animal anxiety research – flaws and prejudices. **Pharmacology Research & Perspectives**, v. 4, n. 2, p. e00223, 2016.

ETKIN, A. Neurobiology of anxiety: From neural circuits to novel solutions? **Depression and Anxiety**, v. 29, n. 5, p. 355–358, 2012.

EVERITT, B. J.; ROBBINS, T. W. Neural systems of reinforcement for drug addiction: from actions to habits to compulsion. **Nature Neuroscience**, v. 8, n. 11, p.1481-1489

FAN, X.; CHAI, L.; ZHANG, H.; WANG, Y.; ZHANG, B.; GAO, X. Borneol depresses P-glycoprotein function by a NF- $\kappa$ B signaling mediated mechanism in a blood brain barrier in vitro model. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 11, p. 27576–27588, 2015.

FERREIRA, P. E. M.; MARTINI, R. K. Cocaine: myths, history and abuse. **Revista Brasileira de Psiquiatria**. vol.23, n.2, p. 96-99; 2001.

GACH, K. et al. The role of morphine in regulation of cancer cell growth. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 384, n. 3, p. 221–230, 2011.

GARAVAN, H.; WEIERSTALL, K. The neurobiology of reward and cognitive control systems and their role in incentivizing health behavior. **Preventive Medicine**, v. 55 Suppl:S17-23. doi: 10.1016/j.ypmed.2012.05.018. Epub 2012.

GARCÍA-ALTÉS. A.; OLLÉ, J. M., ANTOÑANZAS, F.; COLOM, J. The social cost of illegal drug consumption in Spain. **Addiction**. v.97, n. 9, p.1145-1153, 2002.

GARDNER, E. L. Addiction and brain reward and antireward pathways. **Advances in Psychosomatic Medicine Home**.n. 30, p. 22-60, 2011.

GARLET, Q. I.; PIRES, L. C.; SILVA, D. T.; SPALL, S.; GRESSLER, L. T.; BÜRGER, M. E.; BALDISSEROTTO, B.; HEINZMANN, B. M. Effect of (+)-dehydrofukinone on GABAA receptors and stress response in fish model. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 49, n. 1, p. 1–9, 2016.

GONÇALVES, T. M. Antidepressivos E Ansiolíticos Utilizados Na Terapêutica De Problemas Relacionadas À Saúde Mental : Sugerindo Terapias Alternativas Para Fatores Cognitivos E Emocionais. **Informa**, v.18, n. 3, p. 20, 2006.

GRANGER, R. E.; CAMPBELL, E. L.; JOHNSTON, G. A. R. (+)- And (-) - BORneol: Efficacious positive modulators of GABA action at human recombinant GABAA receptors. **Biochemical Pharmacology**, v. 69, n. 7, p. 1101–1111, 2005.

GRAVIELLE, M. C. Activation-induced regulation of GABAA receptors: Is there a link with the molecular basis of benzodiazepine tolerance? **Pharmacological Research**, p. 1–9, 2015.

GREENE, J. G. Causes and consequences of degeneration of the dorsal motor nucleus of the vagus nerve in Parkinson's disease. **Antioxid Redox Signal**, v. 21, n. 4, p. 649–667, 2014.

HALL, A. C.; TURCOTTE, C. M.; BETTS, B. A.; YEUNG, W. Y.; AGYEMAN, A. S.; BURK, L. A. Modulation of human GABA A and glycine receptor currents by menthol and related monoterpenoids. **European Journal of Pharmacology**, v. 506, n. 1, p. 9–16, 2004.

HALLIWELL, B. Oxidative stress and neurodegeneration: Where are we now? **Journal of Neurochemistry**, v. 97, n. 6, p. 1634–1658, 2006.

HANDLEY, S. L. 5-Hydroxytryptamine pathways in anxiety and its treatment. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 66, n. 1, p. 103–148, 1995.

HASCOËT, M.; BOURIN, M. The mouse light-dark box test. **Neuromethods**, v. 42, p. 197–223, 2009.

HERTZ, L. The glutamate-glutamine (GABA) cycle: Importance of late postnatal development and potential reciprocal interactions between biosynthesis and degradation. **Frontiers in Endocrinology**, v. 4, p.1–16, 2013.

IKEMOTOR, S. Brain reward circuitry beyond the mesolimbic dopamine system: A neurobiological theory. **Neuroscience Research**, v. 35, n. 2, p. 129–150, 2010.

ISLAM, M. T. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction-linked neurodegenerative disorders. **Neurological Research**, v. 6412, p. 1–10, 2016.

JAQUEMAR, D.; SCHENKER, T.; TRUEB, B. An Ankyrin-like Protein with Transmembrane Domains Is Specifically Lost after Oncogenic Transformation of Human Fibroblasts lacking in SV40 transformed cells as well as in many. **Biochemistry**, v. 274, n. 11, p. 7325–7333, 1999.

JEON, S. J.; PARK, H.J.; GAO, Q.; PENA, I. J.; PARK, S. J.; LEE, H. E.; WOO, H.; KIM, H. J.; CHEONG, J. H.; HONG, E.; RYU, J. H. Ursolic acid enhances pentobarbital-induced sleeping behaviors via GABAergic neurotransmission in mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 762, p. 443–448, 2015.

JIANG, J.; SHEN, Y. Y.; LI, J.; LIN, Y. H.; LUO, C. X.; ZHU, D. Y. (+)-Borneol alleviates mechanical hyperalgesia in models of chronic inflammatory and neuropathic pain in mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 757, p. 53–58, 2015.

KASTEENPOHJA, T. et al. Treatment received and treatment adequacy of depressive disorders among young adults in Finland. **BMC psychiatry**, v. 15, n. 1, p. 427, 2015.

KEIFLIN, R., REESE, R. M.; WOODS, C. A.; JANAK, P. H. The orbitofrontal cortex as part of a hierarchical neural system mediating choice between two good options. **Journal of Neuroscience**. v. 2, n. 33;p.15989-15998, 2013.

KENNY, P. J. Reward mechanisms in obesity: new insights and future directions. **Neuron**. v. 24; n. 69, p. 664-679, 2011.

KIM, J.; HAM, S.; HONG, H.; MOON, C.; IM, H. I. Brain Reward Circuits in Morphine Addiction. **Molecules and cells**, v. 39, n. 9, p. 645–53, 2016.

KONG, Q. X.; WU, Z. Y.; CHU, X.; LIANG, R. Q.; XIA, M.; LI, L. Study on the anti-cerebral ischemia effect of borneol and its mechanism. **African journal of traditional**,

**complementary, and alternative medicines: AJTCAM / African Networks on Ethnomedicines**, v. 11, n. 1, p. 161–164, 2014.

KONRADI, C.; HECKERS, S. Antipsychotic drugs and neuroplasticity: Insights into the treatment and neurobiology of schizophrenia. **Biological Psychiatry**, v. 50, n. 10, p. 729–742, 2001.

KOOB, G. F. Negative reinforcement in drug addiction: the darkness within. *Curr Opin Neurobiology*. v. 23, n. 4, p. 559-563, 2013.

KOTALIK, J. Controlling pain and reducing misuse of opioids: ethical considerations. **Canadian family physician Medecin de famille canadien**, v. 58, n. 4, p. 381–5, e190–5, 2012.

KREEK, M. J.; LEVRAN, O.; REED, B.; SCHLUSSMAN, S. D.; ZHOU, Y.; BUTELMAN, E. R. Opiate addiction and cocaine addiction: underlying molecular neurobiology and genetics. **Journal of Clinical Investigation**. v.1, n. 122, p. 3387-3393, 2012

KULESSKAYA, N.; VOIKAR, V. Assessment of mouse anxiety-like behavior in the light-dark box and open-field arena: Role of equipment and procedure. **Physiology and Behavior**, v. 133, p. 30–38, 2014.

LEE, N. M. et al. The neurobiology of overeating. **EMBO reports**, v. 13, n. 9, p. 785–790, 2012.

LEONE, L., SCATIGNA, M., DONATI, A., PESCE, C. Bridging supply and demand: relationship between cocaine seizures and prevalence estimates of consumption. **Public Health**. v. 126, n.9, p.740-748, 2012

LI, W. R.; CHEN, R.Y.; YANG, L.; HUANG, T.L.; XU, Q.W.; MI, S. Q.; WANG, N.S. Pharmacokinetics of natural borneol after oral administration in mice brain and its effect on excitation ratio. **European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics**, v. 37, n. 1, p. 39–44, 2012.

LISMAN, J. E, GRACE, A. A. The hippocampal-VTA loop: controlling the entry of information into long-term memory. **Neuron**. v. 2, n. 46, p. 703-713, 2005.

LIU, R.; ZHANG, L.; LAN, X.; LI, L.; ZHANG, T.T.; SUN, J. H.; DU, G. H. Protection by borneol on cortical neurons against oxygen-glucose deprivation/reperfusion: Involvement of anti-oxidation and anti-inflammation through nuclear transcription factor kappaB signaling pathway. **Neuroscience**, v. 176, p. 408–419, 2011.

LYNCH, W.J.; NICHOLSON, K. L.; DANCE, M. E.; MORGAN, R.W.; FOLEY, P. L. Animal models of substance abuse and addiction: Implications for science, animal welfare, and society. **Comparative Medicine**, v. 60, n. 3, p. 177–188, 2010.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA JR, V. F.; GRYNBERG, N. F.; ECHEVARRIA, A. Plantas medicinais: A necessidade de estudos multidisciplinares. **Quimica Nova**, v. 25, n. 3, p. 429–438, 2002.

MAMELI, M.; LÜSCHER, C. Synaptic plasticity and addiction: learning mechanisms gone awry. **Neuropharmacology**. v. 61, n. 7, p. 1052-1059, 2011.

MANAYI, A.; NABAVI, S. M.; DAGLIA, M.; JAFARI, S.; Natural terpenoids as a promising source for modulation of GABAergic system and treatment of neurological diseases. **Pharmacological Reports**, v. 68, n. 4, p. 671–679, 2016.

MATINFAR, M.; ESFAHANI, M. M.; ASLANY, N.; DAVOODI, S. H.; PARSAEI, P.; ZAREI, G.; REISI, P. Effect of repeated morphine withdrawal on spatial learning, memory and serum cortisol level in mice. **Advanced Biomedical Research**, doi: 10.4103/2277-9175.120868. eCollection 2013.

MARGIS, R. et al. Relação entre estressores, estresse e ansiedade. **Revista de Psiquiatria do Rio Grande do Sul**, v. 25, n. suplemento 1, p. 65–74, 2003.

MÁRQUEZ, J.; CAMPOS-SANDOVAL, J. A.; PEÑALVER, A.; MATÉS, J. M.; SEGURA, J. A.; BLANCO, E.; ALONSO, F. J.; FONSECA, F. R. **Neurochemical Research**. (2016) doi:10.1007/s11064-016-2137-0

MARTIN, E. I. et al. The Neurobiology of Anxiety Disorders: Brain Imaging, Genetics, and Psychoneuroendocrinology. **Clinics in Laboratory Medicine**, v. 30, n. 4, p. 865–891, 2010.

MENARD, J.; TREIT, D. Effects of centrally administered anxiolytic compounds in animal models of anxiety. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 23, n. 4, p. 591–613, 1999.

MERIRINNE, E.; KANKAANPÄÄ, A.; LILLSUNDE, P.; SEPPÄLÄ, T. The effects of diazepam and zolpidem on cocaine- and amphetamine-induced place preference. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 62, n. 1, p. 159–164, 1999.

MINAYO, M. C. S.; DESLANDES, S.F. The complexity of relations between drugs, alcohol, and violence. [Article in Portuguese]. **Caderno de Saúde Pública**. v. 30; n. 14, p. 35-42, 1998.

MILLER, P. S.; ARICESCU, A. R. Crystal structure of a human GABA A receptor. **Europe PMC Funders Group**, v. 512, n. 7514, p. 270–275, 2015.

MIZUMORI, S. J.; JO, Y. S. Homeostatic regulation of memory systems and adaptive decisions. **Hippocampus**. v. 23, n. 11, p. 1103-1124, 2013

MOREIRA, L. F. Drogas, economia, tributação e a ética liberal. **Análise Social** [online], n. 204, p. 632-654, 2012.

NATHAN, P. E.; CONRAD, M.; SKINSTAD, A. H. History of the Concept of Addiction. **Annual Review of Clinical Psychology**, v. 12, n. 1, p. annurev-clinpsy-021815-093546, 2016.

NESTERKINA, M.; KRAVCHENKO, I. Synthesis and Pharmacological Properties of Novel Esters Based on Monocyclic Terpenes and GABA. **Pharmaceuticals**, v. 9, n. 2, p. 32, 2016.

NESTLER, E. J. Epigenetic Mechanisms of Drug Addiction. **Neuropharmacology**, v. 144, n. 5, p. 724–732, 2008.

NESTLER, E. J. Transcriptional mechanisms of drug addiction. **Clinical**

**psychopharmacology and neuroscience : the official scientific journal of the Korean College of Neuropsychopharmacology**, v. 10, n. 3, p. 136–43, 2012.

OLSEN, R. W.; SIEGHART, W. International Union of Pharmacology. LXX. Subtypes of  $\gamma$ -Aminobutyric Acid A Receptors: Classification on the Basis of Subunit Composition, Pharmacology, and Function. Update. **Pharmacological Reviews**, v. 60, n. 3, p. 243–260, 2010.

PARDRIDGE, W. M. The blood-brain barrier: bottleneck in brain drug development. **NeuroRx: the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics**, v. 2, n. 1, p. 3–14, 2005.

PASSOS, C. S.; ARBO, M. D.; RATES, S. M. K.; VON, G. L. Terpenóides com atividade sobre o Sistema Nervoso Central (SNC). **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 19, n. 1 A, p. 140–149, 2009.

PAUL, M. D. **A Biosynthetic Approach**. ed. Wiley, p.550, 2002.

PLANETA, C. S. Animal models of alcohol and drug dependence. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 35, n. SUPPL.2, p. 140–146, 2013.

PULICHERLA, K. K.; VERMA, M. K. Targeting therapeutics across the blood brain barrier (BBB), prerequisite towards thrombolytic therapy for cerebrovascular disorders-an overview and advancements. **AAPS PharmSciTech**, v. 16, n. 2, p. 223–33, 2015.

QUINTANS-JÚNIOR, L. J.; GUIMARÃES, A. G.; ARAÚJO, B. E. S.; OLIVEIRA, G. F.; SANTANA, M. T.; MOREIRA, F. V.; SANTOS, M. R. V.; CAVALCANTI, S. C. H.; JÚNIOR, W. L.; BOTELHO, M. A.; RIBEIRO, L. A. A.; NÓBREGA, F. F. F. Carvacrol, borneol and citral reduce convulsant activity in rodents. **African Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 39, p. 6566–6572, 2010.

RANJBARAN, M.; SAHRAEI, H. New View on Treatment of Drug Dependence. **Basic Clin Neurosci**, v. 5, n. 1, p. 96–97, 2014.

RAYOL, A.; SANDES, R.; BLASI, G. DI. Biodiversidade e Diversidade Química e Genética. **Biotecnologia Ciência Desenvolvimento**, p. 28–32, 1999.

REN, J.; ZOU, M.; GAO, P.; WANG, Y.; CHENG, G. Tissue distribution of borneol-modified ganciclovir-loaded solid lipid nanoparticles in mice after intravenous administration. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 83, n. 2, p. 141–148, 2013.

RICHARDSON, N. R.; ROBERTS, D. C. Progressive ratio schedules in drug self-administration studies in rats: a method to evaluate reinforcing efficacy. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 66, n.1, p.1-11.

ROBINSON, S. M.; ADINOFF, B. The Classification of Substance Use Disorders: Historical, Contextual, and Conceptual Considerations. **Behavioral sciences (Basel, Switzerland)**, v. 6, n. 3, 2016.

SAITO, T.; SADOSHIMA, J. Engineered Biosynthesis of Natural Products in Heterologous Hosts. **Chem Soc Rev**, v. 116, n. 8, p. 1477–1490, 2016.

SCHULTZ, W. Predictive reward signal of dopamine neurons. **Journal of Neurophysiology**. v. 80, n. 1, p. 1-27, 1998.

SHERKHELI, M. A.; SCHREINER, B.; HAQ, R.; WERNER, M.; HATT, H. Borneol inhibits TRPA1, a proinflammatory and noxious pain-sensing cation channel. **Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 28, n. 4, p. 1357–1363, 2015.

SHOHAMY, D.; ADCOCK, R. A. Dopamine and adaptive memory. **Trends in Cognitive Sciences**, v.14, n. 10, p. 464-472, 2010.

SOLHI, H.; SALEHI, B.; ALIMORADIAN, A.; PAZOUKI, S.; TAGHIZADEH, M.; SALEH, A. M.; KAZEMIFAR, A. M. Beneficial Effects of Rosmarinus Officinalis for Treatment of Opium Withdrawal Syndrome during Addiction Treatment Programs: A Clinical Trial. **Addict Health**. v. 5, n.3-4, p. 90-94, 2013.

SILVA-FILHO, J. C.; OLIVEIRA, N. N.; ARCANJO, D. D.; QUINTANS-JÚNIOR, L. J.; CAVALCANTI, S. C.; SANTOS, M. R.; OLIVEIRA, R. DE C.; OLIVEIRA, A. P. Investigation of Mechanisms Involved in (-) - BORneol-Induced Vasorelaxant Response on Rat Thoracic Aorta. **Basic & clinical pharmacology & toxicology**, p. 1–7, 2011.

SILVA, M. I.; CITÓ, M. C.; VASCONCELOS, P. F.; VASCONCELOS, S. M.; SOUSA, F. C. Cocaine: historical background, neurobiology of the addiction and relapse and therapeutic perspectives. [Article in Portuguese] **Acta Medica Portuguesa**, v. 23, n. 2, p. 247-258, 2010.

SUZUKI, T.; TSUDA, M.; FUNADA, M.; MISAWA, M. Blockade of morphine-induced place preference by diazepam in mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 280, n. 3, p. 327–330, 1995.

TAKAISHI, M.; UCHIDA, K.; FUJITA, F.; TOMINAGA, M. Inhibitory effects of monoterpenes on human TRPA1 and the structural basis of their activity. **Journal of Physiological Sciences**, v. 64, n. 1, p. 47–57, 2014.

TRAYNOR, J.  $\mu$ -Opioid receptors and regulators of G protein signaling (RGS) proteins: from a symposium on new concepts in mu-opioid pharmacology. **Drug Alcohol Dependence**, v.1; n.121, p. 173-180, 2012.

UNODC (2015). **World Drug report**. 2016

UNODC (2014). **World Drug report**. 2015

URBAN, N. B.; MARTINEZ, D. Neurobiology of addiction: insight from neurochemical imaging. **Psychiatric Clinics of North America**. v. 35, n. 2, p. 521-541, 2012.

VETULANI, J. Drug addiction. Part II. Neurobiology of addiction. **Polish Journal of Pharmacology and Pharmacy**. v. 53, n. 4, p.303-317, 2001.

VIEGAS, C.; DA SILVA BOLZANI, V.; BARREIRO, E. J. OS produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 326–337, 2006.

VOLKOW, N. D.; WANG, G. J.; FOWLER, J.S.; TOMASI, D. Addiction circuitry in the human brain. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**. v. 52, p.321-36, 2012.

WANG, G. et al. Compound salvia pellet, a traditional Chinese medicine, for the treatment of chronic stable angina pectoris compared with nitrates: a meta-analysis. **Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research**, v. 12, n. 1, p. SR1-7, 2006.

WEEKS, J. R. Experimental morphine addiction: method for automatic intravenous injections in unrestrained rats. **Science**. v. 12, n.138, p.143-144, 1962.

WERB, D.; ROWELL, G.; GUYATT, G.; KERR, T.; MONTANER, J.; WOOD, E. Effect of drug law enforcement on drug market violence: a systematic review. **International Journal of Drug Policy**. v. 22, n.2, p.87-94. 2011.

WISE, R. A. Dopamine and reward: the anhedonia hypothesis 30 years on. **Neurotoxicity Research**.v.14, n. 2-3, p.169-183, 2008.

WISE, R. A. Catecholamine theories of reward: a critical review. **Brain research**. v. 25, n.152, p. 215-247, 1978.

XU, P.; LI, Y.; DU, S.; LU, Y.; BAI, J.; GUO, Q. Comparative pharmacokinetics of borneol in cerebral ischemia-reperfusion and sham-operated rats. **Journal of Zhejiang University. Science. B**, v. 15, n. 1, p. 84–91, 2014.

YAN-YU, X.; QI-NENG, P.; ZHI-PENG, C. The enhancing effect of synthetical borneol on the absorption of tetramethylpyrazine phosphate in mouse. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 337, n. 1–2, p. 74–79, 2007.

YU, B.; RUAN, M.; DONG, X.; YU, Y.; CHENG, H. The mechanism of the opening of the blood-brain barrier by borneol: A pharmacodynamics and pharmacokinetics combination study. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 150, n. 3, p. 1096–1108, 2013.

ZHANG, Q.; WU, D.; WU, J.; OU, Y.; UM, C.; HAN, B.; ZHANG, Q. Improved blood-brain barrier distribution: Effect of borneol on the brain pharmacokinetics of kaempferol in rats by in vivo microdialysis sampling. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 162, p. 270–277, 2015.

ZHAO, J.Y.; LU, Y.; DU, S.Y.; SONG, X.; BAI, J.; WANG, Y. Comparative pharmacokinetic studies of borneol in mouse plasma and brain by different administrations. **Journal of Zhejiang University. Science. B**, v. 13, n. 12, p. 990–6, 2012.

ZIMMERMAN, J. L. Cocaine intoxication. **Critical Care Clinics**. v. 28, n. 4, p. 517-526, 2012

ZWENGER, S.; BASU, C. Plant terpenoids: applications and future potentials. **Biotechnology and Molecular Biology Reviews**, v. 3, n. February, p. 1–7, 2008.



## **CAPÍTULO I:**

### **Efeito sedativo, ansiolítico do monoterpene (-) - Borneol em camundongos e sua interação molecular com o GABA<sub>A</sub>R**

Artigo submetido ao periódico BIOMEDICINE & PHARMACOTHERAPY. Qualis capes B1 em Biotecnologia.

## **Efeito ansiolítico/sedativo do monoterpene (-) - Borneol em camundongos e sua interação molecular com o GABA<sub>A</sub>R**

### **RESUMO**

A ansiedade é definida como um sentimento vago e desagradável de medo e apreensão. Quando é excessivamente frequente pode ser considerada patológica. Nos últimos 50 anos os benzodiazepínicos (BDZPs) trouxeram avanços significativos na terapia da ansiedade. Porém, essas drogas provocam efeitos adversos como tolerância e dependência. Moléculas obtidas a partir de produtos naturais são uma fonte viável como opções terapêuticas para os distúrbios da ansiedade. Monoterpenos como carvacrol, mentol, limoneno e timol são compostos naturais derivados de duas unidades de isopreno. Todos esses monoterpenos apresentam propriedades GABAérgicas. Estudos com o monoterpene bicíclico (-) - Borneol [(-) - BOR] demonstram propriedades GABAérgica, anticonvulsivante e vasorrelaxante. O presente trabalho teve o objetivo de investigar o efeito ansiolítico e sedativo do (-) - BOR em modelos animais nas doses de 25, 50 e 100 mg/kg, por via intraperitoneal (i.p) e por intermédio de ferramenta computacional, avaliar se a conformação mais estável da molécula interage com o receptor GABA<sub>A</sub> (GABA<sub>A</sub>R), principal neurotransmissor inibitório do Sistema Nervoso Central. O (-) - BOR apresentou efeito ansiolítico significativo ao aumentar o tempo dos animais nos braços abertos no teste do labirinto em cruz elevado, reduzir a atividade locomotora dos animais no teste do campo aberto e prolongar o tempo dos animais no compartimento claro no teste da caixa claro-escuro. O (-) - BOR apresentou efeito sedativo ao reduzir o tempo de início e prolongar o tempo total de sono induzido por tiopental sódico. No estudo de docagem molecular, o (-) - BOR, na sua conformação mais estável, liga-se ao GABA<sub>A</sub>R através dos aminoácidos Lis 274, Val 50, Gln185, Fen186, Met 49. O diazepam (DZP) liga-se aos aminoácidos Lis 105, Tir 160, Tir 210 e Val 212 na subunidades  $\alpha$ 1 e ao aminoácido Fen 77 na subunidade  $\beta$ 2. Portanto, o (-) - BOR liga-se ao GABA<sub>A</sub>R em um sítio diferente da região em que o DZP se liga. Os resultados demonstram que o (-) - BOR possui atividade ansiolítica, sedativa e possivelmente, esses efeitos possam estar relacionados com a neurotransmissão GABAérgica.

**Palavras-chave:** Ansiedade. (-)-Borneol. Docagem molecular. GABA<sub>A</sub>R. Monoterpene. Sedação.

## ABSTRACT

Anxiety is defined as a vague and unpleasant feeling of fear and apprehension. It can be considered pathological when too frequent. Over the past 50 years, benzodiazepines (BDZPs) have brought significant advances in anxiety therapy. However, these drugs cause adverse effects such as tolerance and dependence. Molecules obtained from natural products are some as therapeutic options for anxiety disorders. Monoterpenes such as carvacrol, menthol, limonene and thymol are natural compounds derived from two isoprene units. All these monoterpenes have GABAergic properties. Studies with the monoterpene (-) - Borneol [(-) - BOR] demonstrated GABAergic activity, anticonvulsive and vasorelaxative properties. The objective of this study was to investigate the sedative and anxiolytic effects of (-) - BOR in animal models at doses of 25, 50 and 100 mg/kg and their interaction with the GABA<sub>A</sub> receptor (GABA<sub>A</sub>R). The (-) - BOR showed significant anxiolytic effect by increasing the time of animals in the open arms in the elevated plus maze test, reducing the animal locomotor activity in open field test and prolonging the time in clear compartment in the light-dark box test. (-) - BOR showed sedative effect by reducing the onset time and prolonging the total sleep time induced by thiopental sodium. In the molecular docking study, (-) - BOR, in its more stable conformation, binds to GABA<sub>A</sub>R through the aminoacids Lys 274, Val 50, Gln185, Phe186, Met 49. Diazepam (DZP) binds to the aminoacids Lys 105, Tyr 160, Tyr 210 and Val 212 in the  $\alpha$ 1 subunits and to the Phe 77 amino acid in the  $\beta$ 2 subunit. Therefore, (-) - BOR binds to GABA<sub>A</sub>R at a site other than the region where DZP binds. The results demonstrate that (-) - BOR has anxiolytic, sedative activity and, possibly, these effects may be related to the GABAergic neurotransmission.

**Keywords:** Anxiety, Sedation, GABA<sub>A</sub>R, Monoterpene, (-) - Borneol, Molecular Docking.

## Introdução

A ansiedade é definida como um sentimento vago e desagradável de medo e apreensão, caracterizada por tensão ou desconforto derivado da antecipação de perigo, do desconhecido ou de algo estranho (BAGATIN et al., 2014). A ansiedade é um componente comportamental normal e é importante como mecanismo de defesa em relação a situações novas e inesperadas. No entanto, quando é excessivamente frequente ou aparece em contextos inadequados, pode interferir no funcionamento normal do organismo e, portanto, ser considerada patológica (DOUKKALI et al., 2015).

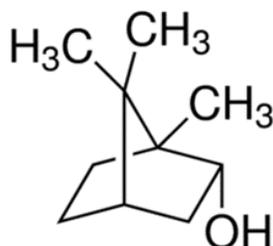
Na década de 60, com o lançamento do Diazepam (DZP) (Valium<sup>®</sup>), teve início uma revolução no tratamento farmacológico da ansiedade. O DZP inovou ao dissociar o efeito ansiolítico do efeito sedativo (CALCATERRA; BARROW, 2014). Assim como o DZP, os outros benzodiazepínicos (BDZs) atuam como moduladores alostéricos do receptor  $\gamma$ -aminobutírico-A (GABA<sub>A</sub>R), promovendo aumento na condutância de íons cloreto para o interior da célula e hiperpolarizando a membrana neuronal. Além do efeito ansiolítico, os BDZs agem como relaxantes musculares, indutores de sono e podem produzir efeitos anticonvulsivantes. Porém essas drogas provocam efeitos adversos como perda de coordenação motora, tolerância e dependência (LIEBRENZ et al., 2015).

Apesar dos avanços terapêuticos obtidos com os BDZs, a busca por ansiolíticos com menos efeitos adversos ainda é um objetivo no tratamento farmacológico dos transtornos da ansiedade. Moléculas obtidas a partir de produtos naturais são uma fonte viável como opções com potencial terapêutico. Os terpenos constituem o grupo mais abundante e estruturalmente mais diversificado de metabólitos secundários de plantas (ZWENGER; BASU, 2008). Além disso, os terpenos possuem uma ampla variedade de funções biológicas e a maioria possui propriedade medicinal (CHENG et al., 2007).

São classificados de acordo com o número de carbonos utilizados na sua biossíntese podendo ser monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos, carotenóides entre outros. Os compostos terpênicos mais frequentes são os monoterpenos (90%) e os sesquiterpenos (CHENG et al., 2007). Monoterpenos como carvacrol, mentol, limoneno e timol são um grupo de compostos naturais derivados de duas unidades de isopreno. Todos esses exemplos de monoterpenos modulam, de alguma forma, o GABA<sub>A</sub>R apresentando propriedades anticonvulsivantes e/ou ansiolíticas (MANAYI et al., 2016).

O (-) - Borneol [(-) - BOR] (**Figura 1**), é um exemplo de monoterpeneo bicíclico amplamente utilizado na indústria de alimentos, medicamentos e cosméticos (CHEN et al., 2014). Estudos com o monoterpeneo (-) - BOR demonstraram propriedades farmacológicas tais como efeito agonista parcial do GABA<sub>A</sub>R (GRANGER; CAMPBELL; JOHNSTON, 2005); efeito anticonvulsivante (QUINTANS-JÚNIOR et al., 2010); efeito vasorrelaxante atribuído ao bloqueio de canais de cálcio sensíveis a voltage (CavL) (SILVA-FILHO et al., 2011) e inibição do receptor potencial transitório vanilóide tipo I (TRPA1) (SHERKHELI et al., 2015). No entanto, ainda são necessários mais estudos que explorem a sua ação farmacológica no sistema nervoso central (SNC). Este trabalho teve o objetivo de investigar a atividade ansiolítica do (-) - BOR sintético em modelos experimentais de ansiedade, assim como, por intermédio de docagem molecular, avaliar se a conformação mais estável da molécula possui alguma interação com o GABA<sub>A</sub>R, principal neurotransmissor inibitório do SNC (BERGMANN et al., 2013).

**Figura 1.** Estrutura química do (-) - BOR



**Fonte:** <http://www.sigmaaldrich.com>

## Material e Métodos

### Substâncias químicas

(-) - BOR e tiopental sódio foram adquiridos da empresa Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA), DZP obtido a partir da empresa Cristália (São Paulo, SP, Brasil). O (-) - BOR foi previamente solubilizados em dimetilsulfóxido (DMSO a 1%) e em seguida diluído em solução salina (NaCl a 0,9%). As outras substâncias foram dissolvidas em NaCl 0,9%.

## Animais

Camundongos *Swiss*, machos (25-30 g), com dois meses de idade provenientes do biotério do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Piauí (CCA/UFPI), foram aclimatados em uma temperatura de  $24 \pm 2$  °C sob um ciclo de claro/escuro de 12 por 12 horas, com livre acesso à comida e a água. Todos os experimentos seguiram protocolos aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal do Piauí (n. 83/14).

### Teste do Labirinto em cruz elevado

O labirinto em cruz elevado (LISTER, 1987) consiste em dois braços abertos perpendiculares (30 x 5 cm) e dois braços fechados (30 x 5 x 25 cm) de posição também perpendicular. Os braços abertos e fechados estão ligados por uma plataforma central (5 x 5 cm). Camundongos *Swiss*, machos (25-30 g), 6 por grupo, foram tratados com: veículo, (-) - BOR (25, 50 e 100 mg/kg, i.p.) ou DZP (2 mg/kg, i.p.). Trinta minutos após o tratamento, os animais foram colocados um por vez no centro do labirinto com a cabeça voltada para um dos braços fechados e observado seu comportamento durante 5 minutos. O parâmetro avaliado foi o tempo de permanência nos braços abertos em segundos.

### Teste do campo Aberto

O equipamento utilizado (30 x 30 x 15 cm) é uma caixa com piso dividido em nove quadrantes iguais baseado no modelo descrito por Archer (1973). Os camundongos *Swiss*, machos (25-30 g), foram reunidos em 6 animais por grupo, foram tratados com: veículo, (-) - BOR (25, 50 e 100 mg/kg, i.p.) ou DZP (2 mg/kg, i.p.). Passados 30 minutos da administração das drogas, os animais foram colocados um por vez, no equipamento sendo observado o número de cruzamentos com as quatro patas (atividade locomotora espontânea), durante 5 minutos. Após cada sessão, o aparato foi limpo com álcool a 70%.

### Teste da caixa claro-escuro

Camundongos *Swiss*, machos (25-30 g), 6 por grupo, foram tratados com: veículo, (-) - BOR (25, 50 e 100 mg/kg, i.p.), ou DZP (2 mg/kg, i.p.). Após 30 minutos os animais

foram colocados, um por vez, no equipamento composto por dois compartimentos, um claro e outro escuro que se comunicam através de uma pequena porta (CRAWLEY, 1981). O compartimento escuro (27 x 18 x 29 cm) é mal iluminado e o compartimento claro (27 x 18 x 29 cm) é iluminado por luz ambiente. Os animais foram colocados um por vez, inicialmente posicionados na parte clara sendo observados durante 5 minutos e entre cada teste, o equipamento foi limpo com álcool à 70%. Foi utilizado como parâmetro o tempo de permanência na caixa clara em segundos.

#### Teste de potencialização do sono induzido por Tiopental Sódico (TPSI)

Camundongos *Swiss*, machos (25-30 g), 6 por grupo, foram tratados com: veículo, (-) - BOR (25, 50 e 100 mg/kg, i.p.), ou DZP (2 mg/kg, i.p.). Imediatamente após a administração das substâncias foi administrado tiopental sódico (50 mg/kg, i.p.). Depois que os animais adormeceram, foram colocados em decúbito dorsal e acionado um cronômetro registrando o tempo entre a perda e a recuperação do reflexo de endireitamento (tempo de sono). Foi considerado como perda do reflexo de endireitamento a incapacidade do animal em retornar para a sua posição normal. Foi considerado como critério de recuperação do reflexo de endireitamento, a volta do animal para a sua posição normal por três vezes consecutivas (CARLINI, 1986).

#### Docagem molecular

A molécula de (-)- BOR foi obtida a partir do banco de dados ZINC (ID: 967533). Após obtenção, a geometria da molécula foi otimizada no programa Gaussian 09 (FRISCH et al., 2009). O método da Teoria do Funcional da Densidade (DFT) (CAPELLE, 2006; CUSTODIO; MORGON, 1995) foi utilizado com o funcional híbrido B3LYP combinado com o conjunto de base 6-31++G\*. Cálculos de frequência foram realizados para verificar se a molécula está em um mínimo de energia. A molécula do GABA<sub>A</sub>R foi obtida a partir do banco de dados Protein Data Bank (ID: 4COF) (BERMAN et al., 2000) e pelo programa AutoDock Tools (ADT) (SANNER, 1999) foi realizado uma busca pela existência de moléculas de água e estruturas de proteínas repetidas.

A docagem molecular foi realizada utilizando o programa AutoDock 4.2.6, que faz uso do algoritmo genético lamarckiano, em combinação com algoritmos de busca global e algoritmos de busca local. Com o uso do ADT criou-se uma malha de afinidade englobando a região extracelular do GABA<sub>A</sub>R e gerou-se, por meio do módulo AutoGrid 4.2.6, os mapas de afinidade entre os átomos do ligante e da macromolécula. Nos parâmetros restantes, foram utilizados os valores default do programa.

#### Análise estatística dos testes comportamentais

Todos os resultados foram apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M). Os dados foram avaliados por análise de variância (ANOVA) seguido pelo t-Student-Neuman-Keuls como *post hoc* teste. Os resultados foram considerados significativos ( $*p < 0,05$ ) quando comparados ao grupo veículo. Todas as análises dos experimentos *in vivo* foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism, versão 6.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, EUA).

## Resultados

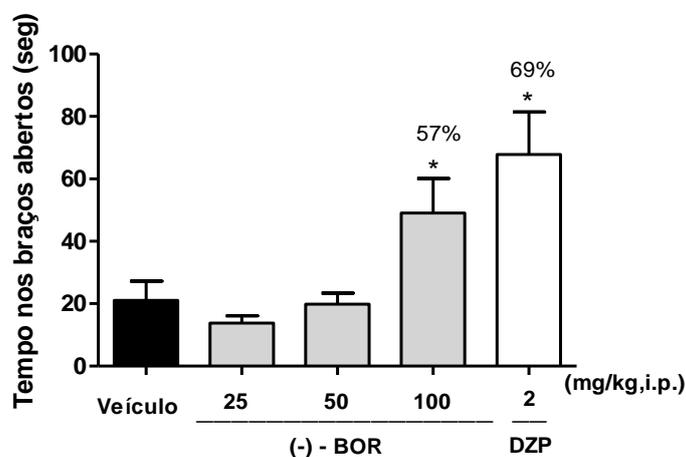
#### Teste do labirinto em cruz elevado

Neste modelo, (-) - BOR (100 mg/kg, i.p) aumentou significativamente ( $*p < 0,05$ ), o tempo dos camundongos nos braços abertos do labirinto em 57% ( $49 \pm 11$  seg) quando comparado com o grupo veículo ( $21 \pm 6$  seg) (**Figura 2**). O DZP (2 mg/kg, i.p.) aumentou o tempo dos animais nos braços abertos em 69% ( $68 \pm 14$  seg) quando comparado com o grupo veículo.

#### Teste do campo aberto

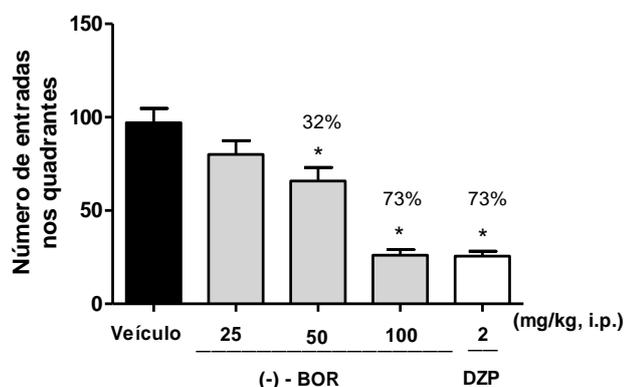
Na avaliação da atividade locomotora, o (-) - BOR (50, 100 mg/kg, i.p.), apresentou efeito significativo ( $*p < 0,05$ ) ao reduzir o número de entradas nos quadrantes em 32% ( $66 \pm 2$ ) e 73% ( $26 \pm 3$ ); respectivamente quando comparado ao grupo veículo ( $97 \pm 8$ ) (**Figura 3**). O DZP (2 mg/kg, i.p.) reduziu significativamente ( $*p < 0,05$ ) o número de entradas nos quadrantes em 73% ( $25 \pm 3$ ) em comparação com o grupo veículo.

**Figura 2.** Efeito do (-) - BOR (25, 50 e 100 mg/kg, i.p.) e do DZP (2 mg/kg, i.p.) no labirinto em cruz elevado com camundongos ( $n = 6$ ).



**Legenda:** Cada barra representa a média  $\pm$  E.P.M do tempo em segundos (seg) em que os animais permaneceram nos braços abertos. \* $p < 0,05$  significativo em comparação ao grupo veículo (ANOVA e teste  $t$ -Student–Newman–Keuls como *post hoc* teste).

**Figura 3.** Efeito do (-) - BOR (25, 50 e 100 mg/kg, i.p.) e do DZP (2 mg/kg, i.p.) no modelo campo aberto com camundongos ( $n = 6$ ).



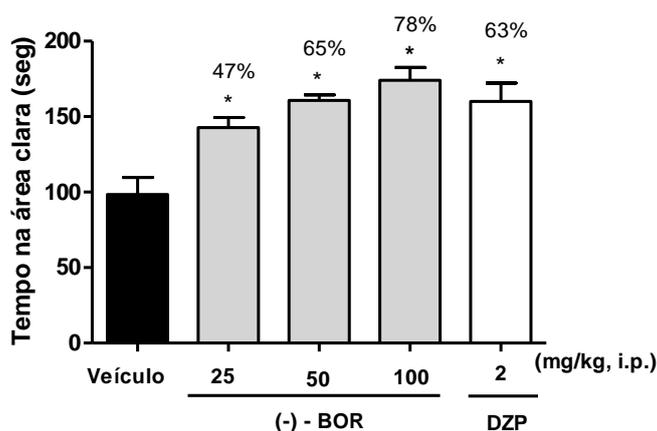
**Fonte:** Cada barra representa a média  $\pm$  E.P.M. de número de quadrantes cruzados pelos animais. \* $p < 0,05$  significativo em comparação ao grupo veículo (ANOVA e teste  $t$ -Student–Newman–Keuls como *post hoc* teste).

#### Teste da caixa claro-escuro

No modelo da caixa claro-escuro, o (-) - BOR (25, 50 e 100 mg/kg, i.p.) demonstrou efeito significativo (\* $p < 0,05$ ) ao aumentar em 47% ( $143 \pm 6$  seg); 65% ( $161 \pm 3$  seg) e 78%

(174±8 seg); respectivamente o tempo de permanência dos camundongos no compartimento claro quando comparado ao grupo veículo (98±11 seg) (**Figura 4**). Em comparação ao grupo veículo o DZP (2 mg/kg, i.p.) aumentou o tempo em 63% (160 ±12,2 seg).

**Figura 4.** Efeito do (-) – BOR (25, 50 e 100 mg/kg, i.p.) e DZP (2 mg/kg, i.p.) no modelo caixa claro-escuro com camundongos ( $n = 6$ ).

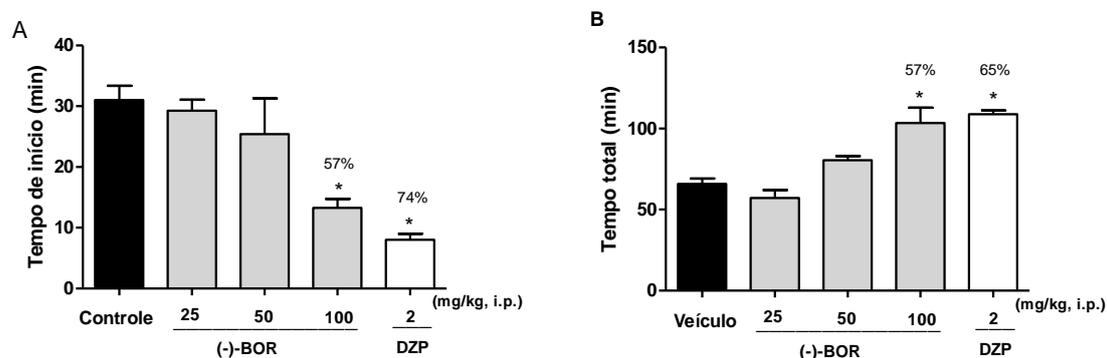


**Legenda:** Cada barra representa a média ± E.P.M do tempo em segundos (seg) dos animais no compartimento claro. \* $p < 0,05$  significativo em comparação ao grupo veículo (ANOVA e teste *t*-Student–Newman–Keuls como *post hoc* teste).

#### TPSI

No teste de sono induzido por tiopental, o (-) - BOR (100 mg/kg, i.p.) obteve efeito significativo (\* $p < 0,05$ ) ao reduzir em 57% (13±1 min) o início do sono e aumentar em 57% (103±9 min) o tempo total de sono em relação ao grupo veículo (31±2; 66±3 min, respectivamente) (**Figura 5 A e B**, respectivamente). Da mesma forma, o DZP (2 mg/kg, i.p.) diminuiu significativamente (\* $p < 0,05$ ) o tempo necessário para o início da sedação e a duração do sono induzido por tiopental em 74% (8±1 min) e 65% (108±2 min), respectivamente, quando comparado ao grupo veículo (**Figura 5 A e B**, respectivamente).

**Figura 5.** Efeito do (-) - BOR (25, 50 e 100 mg/kg, i.p.) e do DZP (2 mg/kg, i.p.) no TPSI em camundongos *Swiss* ( $n = 6$ ).

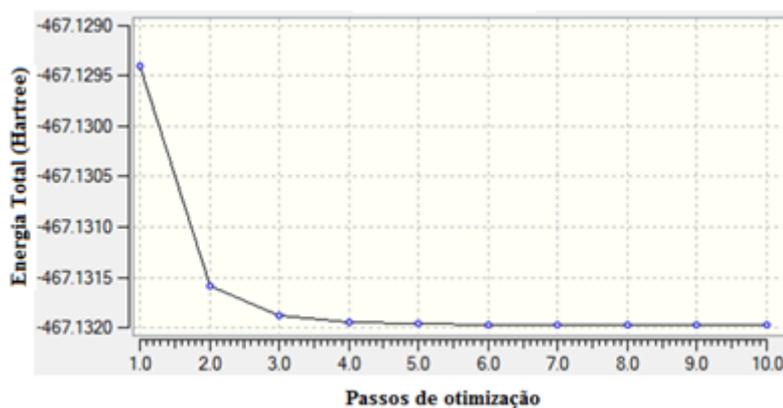


**Legenda:** Cada barra representa a média  $\pm$  E.P.M do tempo de início do sono (A) ou o tempo total de duração do sono (B) em minutos (min). \* $p < 0,05$  significativo em comparação ao grupo veículo (ANOVA e teste *t*-Student–Newman–Keuls como *post hoc* teste).

#### Docagem molecular

No estudo de docagem a conformação mais estável (**Figura 6**), apresenta  $-4,96 \text{ kcal.mol}^{-1}$  e  $231,31 \text{ Ki}$  ( $\mu\text{M}$ ) como energia livre de ligação e constante de inibição, respectivamente (**Tabela 1**). O (-) - BOR interage com os seguintes resíduos de aminoácidos do  $\text{GABA}_{\text{A}}\text{R}$ : Lisina 274 (Lis274), valina 50 (Val50), Glutamina 185 (Gln185), Fenilalanina 186 (Fen186) e Metionina 49 (Met 49) (**Tabela 1**). O desenho tridimensional da docagem entre o  $\text{GABA}_{\text{A}}\text{R}$  e o (-) - BOR indica que a interação ocorre próxima a membrana celular em uma região extracelular (**Figura 7**).

**Figura 6.** Diagrama de energia correlacionada com conformação obtida ao fim do cálculo funcional de densidade. Foi escolhido a conformação que apresentou menor estado energético.

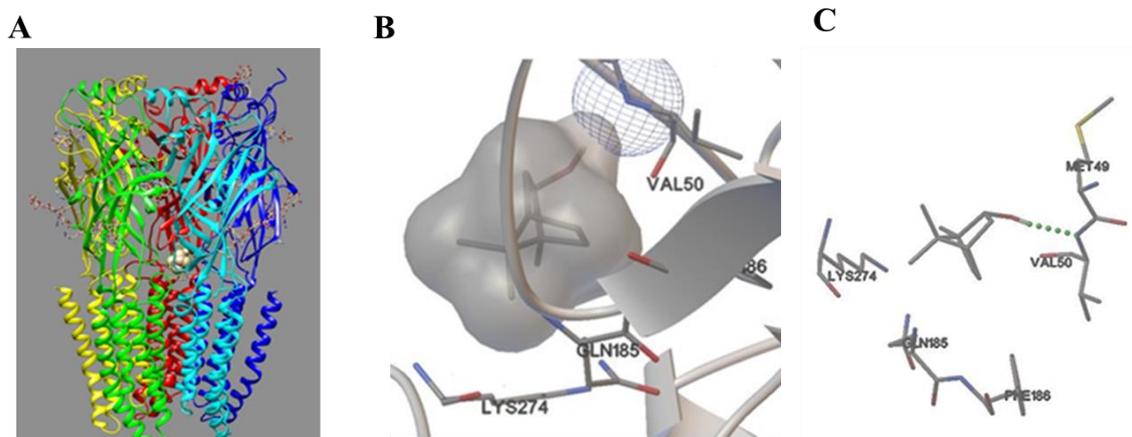


**Tabela 1.** Dados comparativos das três melhores conformações entre (-) - BOR e o GABA<sub>A</sub>R.

Conformação	Energia livre de ligação (Kcal.mol <sup>-1</sup> )	Constante de inibição Ki (μM)	Resíduos de aminoácidos do GABA <sub>A</sub> R	Ligação entre (-) - BOR e Val50	Energia (kcal.mol <sup>-1</sup> )	Comprimento (Å)
1 <sup>a</sup>	-4,96	231,31	Lis274, Val50, Gln185, Fen186, Met49	Ponte de hidrogênio	1,41	2,045
2 <sup>a</sup>	-4,96	230,41	Lis274, Val50, Gln185, Fen186, Met49	Ponte de hidrogênio	-1,43	2,056
3 <sup>a</sup>	-4,89	259,46	Val50, Met 49, Pro184, Gln185, Lis274	Ponte de hidrogênio	-1,72	1,915

**Legenda:** Lis274 (Lisina 274), Val 50 (Valina 50), Gln 185 (Glicina 185), Fen 186 (Fenilalanina 186), Met 49 (Metionina 49), Pro 184 (Prolina 184) e Glu 185 (Glutamina 185).

**Figura 7.** Docagem molecular entre (-) - BOR e o GABA<sub>A</sub>R. **(A)** Imagem frontal representativa da interação entre o monoterpreno (-) - BOR e o GABA<sub>A</sub>R. **(B)** Malha de energia entre as moléculas e **(C)** ponte de hidrogênio entre o aminoácido Val50 e a molécula de (-) - BOR.



## Discussão

Os transtornos de ansiedade são condições psiquiátricas graves que afetam compromissos diários e representam um alto custo para a saúde pública. Se considerarmos o arco composto pelos custos em termos de debilidade, encargos financeiros associados, risco de suicídio (COMBS; MARKMAN, 2014) e os graves efeitos adversos do tratamento dos distúrbios da ansiedade (LIEBRENZ et al., 2015), a busca por alternativas terapêuticas é algo importante a se considerar. Substâncias obtidas a partir de produtos naturais são uma fonte viável para novos ansiolíticos. Diversos monoterpenos como o acetato de carvacrol e óxido de linalol demonstraram propriedades ansiolíticas em modelos experimentais com animais (PIRES et al., 2013; SOUTO-MAIOR et al., 2011). Neste trabalho, o potencial farmacológico do monoterpeno (-) - BOR foi avaliado em modelos animais de ansiedade.

Na investigação do efeito ansiolítico do (-) - BOR, foram utilizados três modelos: o teste do labirinto em cruz elevado, teste do campo aberto e o teste da caixa claro-escuro. Três modelos bastante empregados na avaliação do comportamento exploratório de animais, principalmente roedores (ABDELHALIM et al., 2015; MONIRUZZAMAN et al., 2016). O labirinto em cruz elevado é considerado uma ferramenta valiosa na pesquisa de novos ansiolíticos e no estudo da neurobiologia da ansiedade (RODGERS; DALVI, 1997).

O modelo baseia-se no conflito entre o comportamento natural de explorar um novo ambiente e a tendência em evitar uma área potencialmente perigosa por ser desconhecida (COLLA et al., 2015). Roedores demonstram um padrão de comportamento, evitando espaços abertos e preferindo espaços fechados. Esta tendência é suprimida por ansiolíticos (BOURIN, 2015). Neste teste, somente os animais tratados com 100 mg/kg com (-) - BOR permaneceram mais tempo nos braços abertos reduzindo o efeito ansiogênico desencadeado pelo modelo de forma similar ao efeito observado com o DZP indicando propriedade ansiolítica. Todavia, existe a possibilidade de que drogas que alteram a atividade motora podem acarretar em falsos positivos/negativos no modelo do labirinto em cruz elevado (SILVA et al., 2007). Portanto, para atestar maior segurança e reduzir dúvidas a respeito dos resultados, o teste do campo aberto foi utilizado.

O teste do campo aberto é um modelo clássico aplicado para avaliar os efeitos autonômicos de fármacos e a atividade comportamental geral dos animais (CAMPOS et

al., 2013). No teste do campo aberto, fármacos ansiolíticos reduzem a curiosidade dos animais sobre novos ambientes ao diminuir a atividade locomotora (AMAN et al., 2016; HUSSIN et al., 2012). A atividade locomotora é um indicador de vigília mental ou alerta e sua diminuição pode ser interpretada como redução da excitabilidade do SNC (ISLAM et al., 2015). O tratamento com (-) - BOR reduziu a atividade locomotora dos camundongos diminuindo o número de quadrantes cruzados pelos animais corroborando com os dados encontrados no teste do labirinto em cruz elevado.

O modelo da caixa claro-escuro foi o último teste para ansiedade utilizado. De forma semelhante aos modelos do labirinto em cruz elevado e campo aberto, no modelo da caixa claro-escuro um ambiente novo é apresentado ao animal, desencadeando um nível de estresse que resulta no bloqueio de comportamentos típicos como o exploratório e o locomotor. Geralmente, os animais não tratados movem-se para a área escura da caixa e evitam o estresse de um ambiente novo e mais iluminado (COLLA et al., 2015). Após a administração de uma substância ansiolítica esse comportamento é alterado, o deslocamento para o ambiente escuro diminui e o animal permanece mais tempo na área clara (BOURIN, 2015). Em conformidade com os resultados encontrados nos modelos anteriormente testados, a administração do (-) - BOR resultou em efeito ansiolítico aumentando o tempo dos camundongos na área clara.

Fármacos ansiolíticos e sedativos ativam GABA<sub>A</sub>Rs (CALCATERRA; BARROW, 2014). O modelo TPS é utilizado como uma forma de triagem de drogas para atividade sedativa e hipnótica relacionadas com os GABA<sub>A</sub>Rs. O tiopental sódico liga-se no sítio dos barbitúricos nos GABA<sub>A</sub>Rs e hiperpolariza a membrana pós-sináptica (DE LA PEÑA et al., 2013). BDZs como o DZP potencializam o efeito sedativo do tiopental. Essa potencialização deve-se à ação agonista dos BDZs sobre os GABA<sub>A</sub>Rs (CI; REN; SU, 2008; RAIHAN et al., 2011) aumentando o influxo de Cl<sup>-</sup> para o interior da célula (MULA, 2016). Qualquer substância que diminua o tempo de início e prolongue o efeito sedativo do tiopental apresentará uma possível atividade sobre GABA<sub>A</sub>Rs (RAIHAN et al., 2011). No TPSI o (-) - BOR diminuiu o início e prolongou o tempo de sono induzido por tiopental, constituindo-se em um provável efeito GABAérgico.

Trabalhos anteriores sugerem que o (-) - BOR modula os GABA<sub>A</sub>Rs. Por exemplo, o (-) - BOR reduz crises epiléticas induzidas por pentilenotetrazol (PTZ), um inibidor de neurotransmissão GABAérgica (QUINTANS-JÚNIOR et al., 2010) e Granger, Campbell

e Johnston (2005) avaliaram a capacidade do (+)-BOR e (-) - BOR em modular o receptor humano recombinante de GABA<sub>A</sub>  $\alpha 1\beta 2\gamma 2L$ . No estudo, os autores concluem que (-) - BOR é um agonista parcial dos GABA<sub>A</sub>Rs, mas provavelmente a ativação desses receptores ocorra em sítios não relacionado ao dos BDZs, pois seu efeito não é revertido por flumazenil.

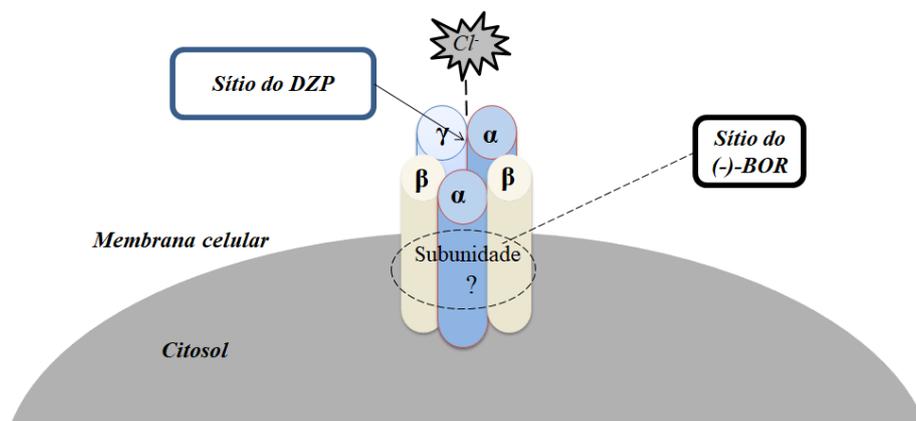
Estruturalmente, os GABA<sub>A</sub>Rs são compostos de uma subunidade  $\gamma$ , duas subunidades  $\alpha$  e duas  $\beta$ . BDZs tais como o DZP ligam-se na porção extracelular dos GABA<sub>A</sub>Rs nas subunidades  $\gamma 2$  e  $\alpha 1$  (RICHTER et al., 2012). Trabalhos de docagem molecular entre o DZP e os GABA<sub>A</sub>Rs indicam que o fármaco se liga aos aminoácidos Lis 105, Tir 160, Tir 210 e Val 212 nas subunidades  $\alpha 1$  e ao aminoácido Fen 77 na subunidade  $\beta 2$  (BERGMANN et al., 2013; CI; REN; SU, 2008). Neste trabalho, foi observado que o (-) - BOR, em sua conformação mais estável, interage com os aminoácidos Lis 274, Val 50, Gln 185, Fen186 e Met 49, aminoácidos diferentes dos aminoácidos encontrados na ligação entre o DZP e os GABA<sub>A</sub>Rs (**Tabela 2**).

O (-) - BOR não é a única molécula que ativaria os GABA<sub>A</sub>Rs em um sítio de ligação diferente dos BDZs. Outros trabalhos demonstram efeitos ansiolíticos de substâncias como o ácido valenérico (BENKE et al., 2009) e carvacrol (MELO et al., 2010) ao se ligarem nos GABA<sub>A</sub>Rs em sítios diferentes dos BDZs. Foram propostos mais de 11 sítios de ligação nos GABA<sub>A</sub>Rs (CHEBIB; JOHNSTON, 2000) e diversos grupos de fármacos (ex. BDZs, barbitúricos, esteroides, picrotoxina, etanol etc) ativam os GABA<sub>A</sub>Rs em diferentes sítios de ligação (JOHNSTON, 1996). Portanto, a docagem molecular do (-) - BOR e o GABA<sub>A</sub>R, indica que a interação ocorre em um sítio extracelular próximo à membrana celular não correspondente ao sítio em que os BDZs se ligam (**Figura 8**).

**Tabela 2.** Comparação entre os sítios de ligação do (-)- BOR e do DZP com o GABA<sub>A</sub>R

Molécula	Subunidade de ligação	Resíduo de aminoácido	Referências
(-) - BOR	—	Lys274, Val50, Gln185, Phe186, Met49	Este trabalho
DZP	$\alpha 1/\gamma 2$	Lys105, Tyr160, Tyr210, Val212/ Phe77	(Ci et al., 2008; Bergmann et al., 2013)

**Figura 8.** Ilustração do sítio de ligação do DZP e a provável região, extracelular, na qual o monoterpeno (-) - BOR liga-se ao GABA<sub>A</sub>R.



Fonte: Arquivo pessoal (2017)

## Conclusões

Assim, os resultados demonstram que o (-) - BOR possui potencial atividade ansiolítica e sedativa. O estudo de docagem molecular, por sua vez, revela que o (-) - BOR é capaz de interagir com os GABA<sub>A</sub>Rs através de pontes de hidrogênio e, teoricamente, essa interação seria capaz de ativar alostericamente o receptor em um sítio diferente dos BDZs produzindo os efeitos ansiolíticos e sedativos observados com os modelos animais. Porém, mais estudos são necessários para se determinar em qual subunidade dos GABA<sub>A</sub>Rs ocorre a interação e como ocorre a ativação do receptor.

## Referências

ABDELHALIM, A.; KARIM, N.; CHEBIB, M.; ABURJAI, T.; KHAN, I.; JOHNSTON, G.A.; HANRAHAN, J. Antidepressant, anxiolytic and antinociceptive activities of constituents from *rosmarinus officinalis*. **Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 18, n. 4, p. 448–459, 2015.

AMAN, U.; SUBHAN, F.; SHAHID, M.; AKBAR, S.; AHMAD, N.; ALI, G.; FAWAD, K.; SEWELL, R.D. *Passiflora incarnata* attenuation of neuropathic allodynia and vulvodinia apropos GABA-ergic and opioidergic antinociceptive and behavioural mechanisms. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 16, n.77, 2016.

- ARCHER, J. Tests for emotionality in rats and mice: A review. **Animal Behaviour**, v. 21, n. 2, p. 205–235, 1973.
- BAGATIN, M.C.; TOZATTI, C.S.; ABIKO, L.A.; YAMAZAKI, D.A.; SILVA P.R.; PEREGO, L.M.; AUDI, E.A.; SEIXAS, F.A.; BASSO, E.A.; GAUZE, G. de F. Molecular Docking and Panicolytic Effect of 8-Prenylnaringenin in the Elevated T-Maze. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 62, n.12, p. 1231–1237, 2014.
- BENKE, D.; BARBERIS, A.; KOPP, S.; ALTMANN, K.H.; SCHUBIGER, M.; VOGT, K.E.; RUDOLPH, U.; MÖHLER, H. GABAA receptors as *in vivo* substrate for the anxiolytic action of valerenic acid, a major constituent of valerian root extracts. **Neuropharmacology**, v.56, n.1, p.174-81, 2009.
- BERGMANN, R.; KONGSBK, K.; SØRENSEN, P.L.; SANDER, T.; BALLE, T. A Unified Model of the GABAA Receptor Comprising Agonist and Benzodiazepine Binding Sites. **PLoS ONE**, v. 8, n. 1, 2013.
- BERMAN, H.M., WESTBROOK, J., FENG, Z., GILLILAND, G., BHAT, T.N. The Protein Data Bank. **Nucleic Acids Research**, v.28, p. 235–242, 2000.
- BOURIN, M. Animal models for screening anxiolytic-like drugs: A perspective. **Dialogues in Clinical Neuroscience**, v. 17, n. 3, p. 295–303, 2015.
- CALCATERRA, N. E.; BARROW, J. C. Classics in Chemical Neuroscience: Diazepam (Valium). **ACS Chemical Neuroscience**, v. 5, n. 4, p. 253–260, 2014.
- CAMPOS, A. C.; FOGAÇA, M. V.; AGUIAR, D. C.; GUIMARÃES, F. S. Animal models of anxiety disorders and stress. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 35, n. SUPPL.2, p. 101–111, 2013.
- CAPELLE, K.; A Bird's-Eye View of Density-Functional Theory. **Brazilian Journal of Physics**, v. 36 n.4, 2006
- CARLINI, E.A.; CONTAR, J. DE D.P.; SILVA-FILHO, A.R.; DA SILVEIRA-FILHO, N.G.; FROCHTENGARTEN, M.L.; BUENO, O. F. Pharmacology of lemongrass (*Cymbopogon citratus Stapf*). I. Effects of teas prepared from the leaves on laboratory animals. **Journal of Ethnopharmacology**, v.17, n.1, p. 37-64,1986.
- CHEBIB, M.; JOHNSTON, G. A. R. GABA-activated ligand gated ion channels: medicinal chemistry and molecular biology. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 43, p.1427–47, 2000.
- CHEN, B. T.; HOPF, F. W.; BONCI, A. Synaptic plasticity in the mesolimbic system. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1187, p. 129–139, 2010.
- CHENG, A. X.; LOU, Y. G.; MAO, Y. B.; LU, S.; WANG, L. J.; CHEN, X. Y. Plant terpenoids: Biosynthesis and ecological functions. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 49, n. 2, p. 179–186, 2007.
- CI, S.; REN, T.; SU, Z. Investigating the putative binding-mode of GABA and diazepam within GABAA receptor using molecular modeling. **Protein Journal**, v. 27, n. 2, p. 71–78, 2008.

COLLA A. R.; ROSA, J. M.; CUNHA, M. P.; RODRIGUES, A. L. Anxiolytic-like effects of ursolic acid in mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 758, p. 171–176, 2015.

COMBS, H.; MARKMAN, J. Anxiety Disorders in Primary Care. **Medical Clinics of North America**, v. 98, n. 5, p. 1007–1023, 2014.

CRAWLEY, J.N. Neuropharmacologic specificity of a simple model for the behavioural actions of benzodiazepines. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 15, p. 695–699, 1981.

CUSTODIO, R.; MORGON, N.H. **Química Nova**, v.18, p. 44-55, 1995.

DE LA PEÑA, J.B.; LEE, H.L.; YOON, S.Y.; KIM, G.H.; LEE, Y.S.; CHEONG, J.H. The involvement of magnoflorine in the sedative and anxiolytic effects of *Sinomeni Caulis* et *Rhizoma* in mice. **Journal of Natural Medicines**, v. 67, n. 4, p. 814–821, 2013.

DOUKKALI, Z.; TAGHZOUTI, K.; BOUIDIDA, E.L.; NADJMOUDDINE, M.; CHERRAH, Y.; ALAOUI, K. Evaluation of anxiolytic activity of methanolic extract of *Urtica urens* in a mice model. **Behavioral and Brain Functions**, v. 11, n. 1, p. 1–5, 2015.

FRISCH, M. J.; TRUCKS, G. W.; SCHLEGEL, H. B.; SCUSERIA, G. E.; ROBB, M. A.; CHEESEMAN, J. R.; SCALMANI, G.; BARONE, V.; MENNUCCI, B.; PETERSSON, G. A.; NAKATSUJI, H.; CARICATO, M.; LI, X.; HRATCHIAN, H. P.; IZMAYLOV, A. F.; BLOINO, J.; ZHENG, G.; SONNENBERG, J. L.; HADA, M.; EHARA, M.; TOYOTA, K.; FUKUDA, R.; HASEGAWA, J.; ISHIDA, M.; NAKAJIMA, T.; HONDA, Y.; KITAO, O.; NAKAI, H.; VREVEN, T.; MONTGOMERY, J. A., JR.; PERALTA, J. E.; OGLIARO, F.; BEARPARK, M.; HEYD, J. J.; BROTHERS, E.; KUDIN, K. N.; STAROVEROV, V. N.; KOBAYASHI, R.; NORMAND, J.; RAGHAVACHARI, K.; RENDELL, A.; BURANT, J. C.; IYENGAR, S. S.; TOMASI, J.; COSSI, M.; REGA, N.; MILLAM, M. J.; KLENE, M.; KNOX, J. E.; CROSS, J. B.; BAKKEN, V.; ADAMO, C.; JARAMILLO, J.; GOMPERTS, R.; STRATMANN, R. E.; YAZYEV, O.; AUSTIN, A. J.; CAMMI, R.; POMELLI, C.; OCHTERSKI, J. W.; MARTIN, R. L.; MOROKUMA, K.; ZAKRZEWSKI, V. G.; VOTH, G. A.; SALVADOR, P.; DANNENBERG, J. J.; DAPPRICH, S.; DANIELS, A. D.; FARKAS, Ö.; FORESMAN, J. B.; ORTIZ, J. V.; CIOSLOWSKI, J.; FOX, D. J. Gaussian 09, Revision D.01; Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2009

GRANGER, R. E.; CAMPBELL, E. L.; JOHNSTON, G. A. R. (+)- And (-) - BORneol: Efficacious positive modulators of GABA action at human recombinant GABAA receptors. **Biochemical Pharmacology**, v. 69, n. 7, p. 1101–1111, 2005.

HUSSIN, A.T.; FRASER, L.M.; RAMOS, A.; BROWN, R.E. The effect of chlordiazepoxide on measures of activity and anxiety in Swiss-Webster mice in the triple test. **Neuropharmacology**, v. 63, n. 5, p. 883–889, 2012

ISLAM, NU.; KHAN, I.; RAUF, A.; MUHAMMAD, N.; SHAHID, M.; SHAH, M.R. Antinociceptive, muscle relaxant and sedative activities of gold nanoparticles generated by methanolic extract of *Euphorbia milii*. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v.15, n.160, 2015.

- LIEBRENZ, M.; GEHRING, M.T.; BUADZE, A.; CAFLISCH, C. High-dose benzodiazepine dependence: a qualitative study of patients' perception on cessation and withdrawal. **BMC psychiatry**, v. 15, p. 116, 2015.
- LISTER, R.G. The use of a plus maze to measure anxiety in the mouse. **Psychopharmacology**, v. 25, p. 180-185, 1987.
- MANAYI, A.; NABAVI, S.M.; DAGLIA, M.; JAFARI, S. Natural terpenoids as a promising source for modulation of GABAergic system and treatment of neurological diseases. **Pharmacological Reports**, v. 68, n. 4, p. 671-679, 2016.
- MELO, F. H.; VENÂNCIO, E.T.; DE SOUSA, D. P.; DE FRANÇA FONTELES, M. M.; DE VASCONCELOS, S. M.; VIANA, G. S.; DE SOUSA, F. C. Anxiolytic-like effect of Carvacrol (5-isopropyl-2-methylphenol) in mice: involvement with GABAergic transmission. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. 24, n.4, p. 437-43, 2010.
- MONIRUZZAMAN, M.; SHAROTI BHATTACHARJEE, P.; RAHMAN PRETTY, M.; SARWAR HOSSAIN, M. Sedative and Anxiolytic-Like Actions of Ethanol Extract of Leaves of *Glinus oppositifolius* (Linn.) Aug. DC. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2016. doi: 10.1155/2016/8541017
- MULA, M. Using anxiolytics in epilepsy: neurobiological, neuropharmacological and clinical aspects. **Epileptic Disord**, v.1, n.18, p. 217-27, 2016.
- PIRES, L. F.; COSTA, L. M.; SILVA, O. A.; DE ALMEIDA, A. A.; CERQUEIRA, G. S.; DE SOUSA, D. P.; DE FREITAS, R. M. Anxiolytic-like effects of carvacryl acetate, a derivative of carvacrol, in mice. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 112, p. 42-48, 2013.
- PLANETA, C. S. Animal models of alcohol and drug dependence. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 35, n. SUPPL.2, p. 140-146, 2013.
- QUINTANS-JÚNIOR, L. J.; GUIMARAES, A. G.; ARAÚJO, B. E. S.; OLIVEIRA, G. F.; SANTANA, M. T.; MOREIRA, F. V.; SANTOS, M. R. V.; CAVALCANTI, S. C. H.; JÚNIOR, W. DE L.; BOTELHO, M. A.; RIBEIRO, L. A. A.; NÓBREGA, F. F. F.; ALMEIDA, R. N. Carvacrol, borneol and citral reduce convulsant activity in rodents. **African Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 39, p. 6566-6572, 2010.
- RAIHAN, M.O.; HABIB, M.R.; BRISHTI, A.; RAHMAN, M.M.; SALEHEEN, M.M.; MANNA, M. Sedative and anxiolytic effects of the methanolic extract of *Leea indica* (Burm. f.) Merr. leaf. **Drug Discoveries & Therapeutics**, v. 5, n. 4, p. 185-189, 2011.
- RIAHI, E. et al. Attenuation of morphine withdrawal signs by a GABAB receptor agonist in the locus coeruleus of rats. **Behavioural Brain Research**, v. 196, n. 1, p. 11-14, 2009.
- RICHTER, L.; GRAAF, C. DE.; SIEGHART, W.; VARAGIC, Z.; MÖRZINGER, M.; ESCH, I. J. P. DE; ECKER, G. F.; ERNST, M. Diazepam-bound GABAA receptor models identify new benzodiazepine binding-site ligands. **Nature Chemical Biology**, v. 8, n.5, p. 455-464, 2012.
- RODGERS, R. J.; DALVI, A. Anxiety, defence and the elevated plus-maze. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 21, n. 6, p. 801-810, 1997.

SANNER, M.F. Python: a programming language for software integration and development. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, v.17, p. 57–61, 1999.

SHERKHELI, M. A.; SCHREINER, B.; HAQ, R.; WERNER, M.; HATT, H. Borneol inhibits TRPA1, a proinflammatory and noxious pain-sensing cation channel. **Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 28, n. 4, p. 1357–1363, 2015.

SILVA-FILHO, J. C.; OLIVEIRA, N.N.; ARCANJO, D.D.; QUINTANS-JÚNIOR, L.J.; CAVALCANTI, S.C.; SANTOS, M.R.; OLIVEIRA, R.C.; OLIVEIRA, A.P. Investigation of Mechanisms Involved in (-) - BORneol-Induced Vasorelaxant Response on Rat Thoracic Aorta. **Basic & clinical pharmacology & toxicology**, p. 1–7, 2011.

SILVA, M. I.; DE AQUINO NETO, M. R.; TEIXEIRA NETO, P. F.; MOURA, B. A.; DO AMARAL, J. F.; DE SOUSA, D. P.; VASCONCELOS, S. M.; DE SOUSA, F. C. Central nervous system activity of acute administration of isopulegol in mice. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 88, n. 2, p. 141–147, 2007.

SOUTO-MAIOR, F. N.; DE CARVALHO, F. L.; DE MORAIS, L. C.; NETTO, S. M.; DE SOUSA, D. P.; DE ALMEIDA, R. N. Anxiolytic-like effects of inhaled linalool oxide in experimental mouse anxiety models. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 100, n. 2, p. 259–263, 2011.

ZWENGER, S.; BASU, C. Plant terpenoids: applications and future potentials. **Biotechnology and Molecular Biology Reviews**, v. 3, n.1, p. 1–7, 2008.



**CAPÍTULO II:**

**Efeito *in vivo* do (-) - Borneol sobre a adicção/abstinência por morfina e sua  
avaliação genotóxica em sangue periférico de camundongos**

Artigo submetido ao periódico Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology.  
Qualis capes B1 em Biotecnologia

## **Efeito *in vivo* do (-) - Borneol sobre a dependência/abstinência por morfina e sua avaliação genotóxica em sangue periférico de camundongos**

### **RESUMO**

A morfina (MOR) é o fármaco de escolha no tratamento de dores agudas, moderadas e graves. A dependência a esse e outros opioides é um dos fatores que estimulam a pesquisa por novas drogas com menos efeitos adversos. Uma alternativa baseia-se no desenvolvimento de fármacos que amenizem a dependência sendo pré-administrados em tratamentos clínicos que necessitem de opioides como grupo farmacoterapêutico de escolha. Esses fármacos possibilitariam a melhoria na qualidade de vida de pacientes que necessitam dessas substâncias ou que já são adictos. Uma molécula com interessante potencial terapêutico é o (-) - Borneol [(-) - BOR], um monoterpeneo bicíclico que pode ser encontrado em óleos essenciais de várias plantas medicinais ou como uma molécula sintética. Trabalhos anteriores demonstraram que o (-) - BOR possui perfil de agonista parcial dos receptores GABA<sub>A</sub> (GABA<sub>A</sub>R) e pode antagonizar canais de Ca<sup>2+</sup> sensíveis a voltagem (Ca<sub>v</sub>L), respectivamente o mais importante neurotransmissor inibitório do sistema nervoso central (SNC) e o íon fundamental na formação de memória a longo prazo, ambos relacionados com os mecanismos de dependência à opioides. Portanto, esse trabalho teve o objetivo de avaliar o efeito do (-) - BOR nas doses de 25, 50 e 100 mg/kg, por via intraperitoneal (i.p.) em modelo de dependência e abstinência a MOR assim como o seu efeito genotóxico em sangue periférico de camundongos. No modelo de Preferência Condicionada por Lugar (PCL) o pré-tratamento com (-) - BOR (100 mg/kg, i.p.) reduziu o tempo de permanência dos animais no compartimento em que foram pareados com MOR. A administração de (-) - BOR (100 mg/kg, i.p.) também reduziu o comportamento de saltar no modelo de abstinência a MOR precipitado pela administração de naloxona (8 mg/kg, i.p.), porém, não interferiu nos comportamentos de andar em marcha ré, tremor de pata e agitação de cachorro molhado. O (-) - BOR (100 mg/kg, i.p.) não apresentou efeito genotóxico quando comparado ao grupo controle ciclofosfamida (CICLO, 50 mg/kg, i.p) nas primeiras 4 horas de avaliação assim como nas 24 horas posteriores, período que corresponde ao tempo de reparo da fragmentação do DNA. Assim, nossos resultados indicam que o (-) - BOR apresentou efeito antiadictivo ao reduzir o desenvolvimento de PCL por MOR e foi capaz de amenizar um dos sintomas de abstinência a MOR relacionado clinicamente como agitação e irritabilidade. Além disso, seu baixo efeito genotóxico indica segurança a sua potencial aplicação farmacoterapêutica.

**Palavras-chave:** Abstinência. Adicção. (-) – Borneol. Genotoxicidade. Monoterpeneo. Morfina.

## ABSTRACT

Morphine (MOR) is the drug of choice for the treatment of acute, moderate and severe pain. The dependence on this and other opioids is one of the factors that stimulate the search for new drugs with less adverse effects. An alternative is based on the development of addictive drugs that are pre-administered in clinical trials requiring opioids as the pharmacotherapeutic group of choice. These drugs would enable the improvement of the quality of life of patients who need these substances or who are already addicted. One molecule with interesting therapeutic potential is (-) - Borneol [(-) - BOR], a bicyclic monoterpene that can be found either in essential oils of various medicinal plants or as a synthetic molecule. A previous work has demonstrated that (-) - BOR has a partial agonist profile of GABA<sub>A</sub> receptors (GABA<sub>A</sub>R) and can antagonize voltage-sensitive Ca<sup>2+</sup> channels (CavL), respectively, the most important inhibitory neurotransmitter of the central nervous system (CNS) and the fundamental ion in the formation of long-term memory, both related to the opioid dependence mechanism. Therefore, the objective of this study was to evaluate the effect of (-) - BOR in the 25, 50 and 100 mg/kg doses intraperitoneally (i.p.) in a model of dependence and withdrawal to MOR as well as its genotoxic effect in Peripheral blood of mice. Pre-treatment with (-) - BOR (100 mg/kg, i.p.) reduced the spent time of the animals in the compartment where they were paired with MOR in Conditioned Preference Place (CPP) model. Administration of (-) - BOR (100 mg/kg, i.p.) also reduced jumping behavior in the MOR withdrawal model precipitated by the administration of naloxone (8 mg/kg, i.p.), but did not interfere in other behaviors. (-) - BOR (100 mg/kg, i.p.) did not show genotoxic effect when compared to the cyclophosphamide control group (CYCLO, 50 mg / kg, i.p) in the first 4 hours of evaluation as well as in the subsequent 24 hours, a period that corresponds to the repair time of DNA fragmentation. Thus, our results indicate that (-)-BOR had an anti-addictive effect by reducing the development of CPP by MOR and was able to attenuate one of the withdrawal symptoms to clinically related MOR, such as agitation and irritability. In addition, its low genotoxic effect indicates safety to its potential pharmacotherapeutic application.

**Keywords:** Addiction · Abstinence · Morphine · Monoterpene · (-) - Borneol · Genotoxicity

## Introdução

Opioides, como a morfina (MOR), são fármacos de escolha no tratamento de dores agudas, moderadas e graves (VOLKOW et al., 2014). Tanto a prescrição controlada de MOR, como o seu uso recreativo tem aumentado nos últimos anos provocando uma epidemia de dependência e mortes por overdose (VARRASSI; MÜLLER-SCHWEFE, 2012). Por ser altamente adictiva a MOR é capaz de provocar recaídas mesmo anos após a sua última administração (BLONDELL; AZADFARD; WISNIEWSKI, 2013).

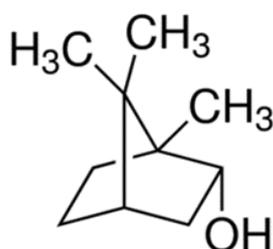
Pesquisas estão sendo realizadas com o objetivo de se encontrar fármacos capazes de substituir o uso de opioides no tratamento da dor (ARAÚJO et al., 2016; BAENAS et al., 2017; LIU et al., 2015) ou com o intuito de prevenir a dependência a opioides através de uma administração prévia a administração desse grupo terapêutico (DE GUGLIELMO et al., 2017; PARVARDEH et al., 2016). Esses fármacos possibilitariam a melhoria na qualidade de vida de pacientes que necessitam de opioides ou que já são adictos.

Plantas medicinais (GAO et al., 2014; HASANEIN; TEIMURI; EMAMJOMEH, 2015) ou moléculas obtidas a partir de plantas medicinais (HU et al., 2015; MANSOURI; NAGHIZADEH; GHORBANZADEH, 2014), como os monoterpenos, são opções na busca por novos fármacos com a finalidade de reduzir a dependência a opioides. O (-) - Borneol [(-) - BOR] (**Figura 1**) é um monoterpeno bicíclico com grande aplicação nas indústrias alimentícia, cosmética e farmacêutica, podendo ser obtido a partir de óleos essenciais de plantas medicinais (ex. *Matricaria recutita* L e *Valeriana officinalis* L) (PIERONI et al., 2002; MIRABI et al., 2011) ou como produto sintético (CHEN et al., 2014).

Dentre as atividades farmacológicas atribuídas ao (-) - BOR destaca-se a sua capacidade em agir como agonista parcial sobre receptores do ácido-gama-aminobutírico-A (GABA<sub>A</sub>R) (GRANGER; CAMPBELL; JOHNSTON, 2005), neurotransmissor importante na cascata bioquímica da adicção à opioides (TRANG et al., 2015) e o efeito vasorrelaxante proveniente do bloqueio de canais de cálcio sensíveis a voltage (Ca<sub>v</sub>L) (SILVA-FILHO et al., 2011) íon necessário na sinalização da formação da memória de longo prazo (BADALÀ; NOURI-MAHDAVI; RAOOF, 2008). Tanto a ativação do GABA quanto o bloqueio dos canais de Ca<sup>2+</sup> são estratégias promissoras no desenvolvimento de novos fármacos na terapia da adicção as drogas (ADDOLORATO et

al., 2012). Além disso, o estudo farmacocinético do (-) - BOR demonstra que este é bem distribuído no Sistema Nervoso Central (SNC), principalmente no hipocampo (YU et al., 2013) uma das áreas mesocorticolímbicas que compõem o sistema recompensa (FOWLER et al., 2007; LISMAN; GRACE, 2005) e peça fundamental no desenvolvimento de dependência à opioides e outras drogas (KOSTEN; GEORGE, 2002; MASSALY; MORÓN; AL-HASANI, 2016; TRANG et al., 2015; ZHANG; LOH; LAW, 2016).

**Figura 1.** Estrutura química do (-) - BOR



**Fonte:** <http://www.sigmaaldrich.com>

O presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito do (-) - BOR sintético em modelos de adicção e abstinência à morfina, assim como avaliar o seu potencial genotóxico em sangue periférico de camundongos.

## Material e Métodos

### Animais

Foram utilizados camundongos *Swiss*, machos (25-30 g), provenientes do Biotério do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Piauí (CCA/UFPI), mantidos sob condições controladas de temperatura ( $22 \pm 2$  °C) e umidade relativa ( $45 \pm 2\%$ ) em um ciclo claro-escuro de 12/12 horas com livre acesso à comida e água. Os animais foram aclimatados por um período de 7 dias antes do início dos protocolos experimentais. Os protocolos utilizados foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal

da UFPI (n. 83/14) e todos os esforços foram realizados na tentativa de minimizar o sofrimento dos mesmos.

## Drogas

(-) - BOR, naloxona e ciclofosfamidas foram adquiridos da empresa Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA), MOR obtido a partir da Cristália (São Paulo, SP, Brasil). O (-) - BOR foi previamente solubilizado em dimetilsulfóxido (DMSO a 1%) e em seguida diluído em solução salina (NaCl a 0,9%). As outras drogas foram dissolvidas em NaCl 0,9%.

## Protocolos experimentais

### Efeito do (-) - BOR sobre a Preferência Condicionado por lugar (PCL)

O experimento baseia-se no modelo de condicionamento Pavloviano, no qual é estabelecido uma associação entre um determinado ambiente e o animal (KASTURE et al., 2009; MATTIOLI; TITOMANLIO; PERFUMI, 2012; PLANETA, 2013). Foi utilizado um aparato formado por três compartimentos distintos (140 mm x 440 mm x 150 mm) possuindo assoalhos e paredes confeccionados com texturas e cores diferentes. O compartimento A possui paredes em preto com piso em barras de aço inox. O compartimento B (túnel de conexão) possui paredes e chão na cor cinza claro. O compartimento C possui paredes em branco, listras pretas e com piso em chapa de aço inox vazado. Os compartimentos descritos acima são conectados por portas em formato de guilhotina, fechados e abertos manualmente. O protocolo foi realizado em 10 dias a contar do dia zero (0) e divididos em três fases: pré-condicionamento, condicionamento e pós-condicionamento.

### *Fase de pré-condicionamento*

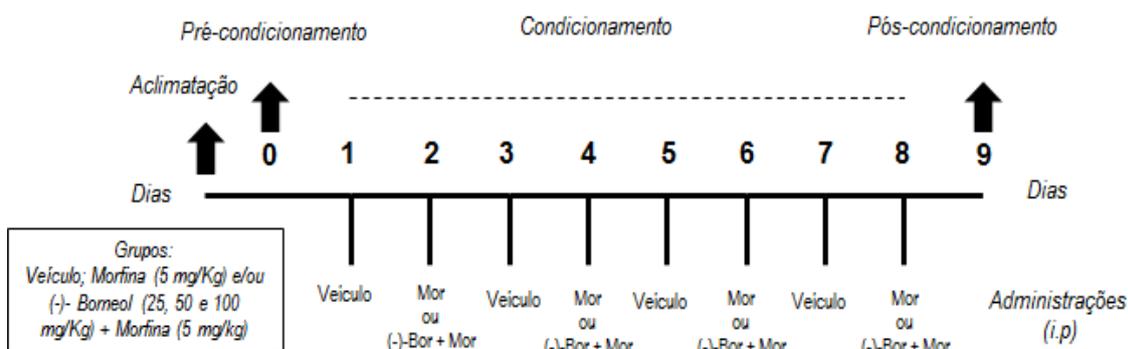
Durante essa fase (dia 0), um animal por vez foi colocado no compartimento B e logo após, as portas foram removidas manualmente para que tivessem acesso a todos os ambientes do aparato durante um período de 15 minutos. Cada deslocamento foi

registrado e foram retirados da fase seguinte os camundongos que apresentassem preferência ( $\geq 75\%$  da sessão, 435 segundos) ou aversão ( $\leq 25\%$  da sessão, 217,5 segundos) a algum dos compartimentos do aparato.

#### *Fase de condicionamento.*

Essa fase foi realizada um dia após a fase de pré-condicionamento, durante oito dias consecutivos com sessões de 30 minutos cada. Os camundongos foram colocados, um por vez, em um dos compartimentos ficando isolados dos outros compartimentos. O compartimento dos animais que receberam MOR foi escolhido aleatoriamente e contrabalanceado por outro grupo de animais, de modo que um grupo ficou confinado ao compartimento listrado, enquanto que o outro foi confinado ao compartimento escuro. Os animais foram divididos em cinco grupos. Um grupo foi tratado com veículo (i.p) nos dias 1, 3, 5 e 7 e os outros quatro grupos com MOR (5 mg/kg, i.p.) nos dias 2, 4, 6 e 8. Três grupos tratados com MOR receberam (-) - BOR (25, 50 e 100 mg/kg, i.p.), trinta minutos antes da administração do opióide, de acordo com o desenho experimental apresentado na **Figura 2**. No dia em que não se administrava MOR os animais receberam veículo.

**Figura 2.** Diagrama esquemático do modelo de PCL. O modelo é dividido em três fases: Pré-condicionamento, condicionamento e pós-condicionamento. O efeito reforçador da MOR é avaliado através do tempo de permanência do animal em um dos compartimentos em que ficou confinado.



**Fonte:** adaptado de Li et al., 2013

### *Fase de pós-condicionamento (Fase teste)*

No dia 9, os animais foram colocados, um por vez, no compartimento B do aparato, as portas em estilo guilhotina foram removidas, deixando-os com livre acesso aos ambientes do aparato por 15 minutos. O tempo de permanência em cada compartimento foi registrado e subtraído ao tempo registrado na fase de pré-condicionamento.

### Efeito do (-) - BOR sobre sintomas de abstinência à MOR desencadeado por naloxona

Camundongos *Swiss*, machos (25-30 g), 6 por grupo, foram tratados com: veículo, (-) - BOR (25, 50 e 100 mg/kg, i.p.) 15 minutos antes da administração de MOR (5 mg/kg, i.p.) e MOR (5mg/kg, i.p.). A dependência foi induzida através da administração de MOR (5 mg/kg, i.p.) duas vezes ao dia (6 e 18 horas) durante 5 dias. No 6º dia, 2 horas após a primeira administração de MOR, naloxona (8 mg/kg, i.p.) foi administrada para precipitação da síndrome de abstinência. Imediatamente após a administração de naloxona, os camundongos foram colocados em gaiolas metabólicas durante um período de 30 minutos, para observação dos sinais de abstinência (saltar, andar em marcha ré, tremor de pata e agitação de cachorro molhado) (GRAMAGE; VICENTE-RODRÍGUEZ; HERRADÓN, 2015).

### Avaliação genotóxica do (-) - BOR pelo ensaio do cometa

Camundongos *Swiss*, machos (25-30 g), 6 por grupo, foram tratados com: veículo, (-) - BOR (100 mg/kg, i.p.) ou Ciclofosfamida (CICLO, 50 mg/kg, i.p.). O ensaio do cometa foi realizado em sangue periférico retirado da cauda de cada animal. A primeira amostra foi processada 4 horas após o final da exposição (efeito agudo) e a segunda coleta após 24 horas (tempo de reparo). No final de cada período foram recolhidos 40 µL de sangue e transferidos para microtubos contendo 120 µL de agarose de baixo ponto de fusão (1,5%) a 37 °C. A mistura homogeneizada foi transferida para lâminas cobertas com agarose, recebendo lamínulas e armazenadas a 4 °C durante 30 minutos (DA SILVA et al., 2010). Em seguida, as lâminas foram removidas e imersas em cuvetes de vidro verticais contendo solução de lise [NaCl (2,5 M); EDTA (100 mM) e 1,2 g de TRIS (10 mM)]. Após utilização, adicionou-se Triton X-100 a 1% e 10% de DMSO. As lâminas

foram colocadas num recipiente contendo tampão electroforético, pH > 13,0 (NaOH 300 mM e EDTA 1 mM), preparado a partir de uma solução stock de NaOH 10 N e 200 mM EDTA, pH 10,0) e deixados em repouso durante 20 minutos. A "corrida" electroforética foi realizada com 25 V e 300 mA a uma temperatura de 4 °C, durante 15 minutos, no escuro. Após a electroforese, as lâminas foram removidas do recipiente e imersas em solução neutralizante (Tris 0,4 M, pH 7,5, durante 5 minutos). Este processo foi realizado em triplicata. Finalmente, foram enxaguadas com água destilada e secas, lavando-as com GelRed (Diluição 2,0: 10 000 µL durante 10 minutos).

Todas as lâminas foram analisadas por microscopia de imunofluorescência (ampliação x 40), equipada com um filtro de excitação (420-490 nm) e filtro de barreira (520 nm). As imagens foram capturadas usando um sistema Opton (câmera digital CCD, 5.0 mega pixel para imunofluorescência). O dano ao DNA foi avaliado através da medição da porcentagem de DNA na cauda (% de medição de DNA da proporção do DNA total presente na cauda) e da cauda momentum (TM-comprimento da cauda vezes a porcentagem de DNA na cauda) (KUMARAVEL et al., 2009). Estes parâmetros foram calculados em 100 nucleóides/amostra (duas lâminas por indivíduo) utilizando o software OpenComet (GYORI et al., 2014).

#### Análise estatística

Os valores foram expressos como média ± erro padrão da média (E.P.M.). As diferenças entre os grupos foram determinadas por meio de Análise de Variância (ANOVA), seguida por Tukey como *post hoc* teste. Os valores foram considerados significativos quando  $*p < 0,05$ . Todas as análises foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism, versão 6.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, EUA).

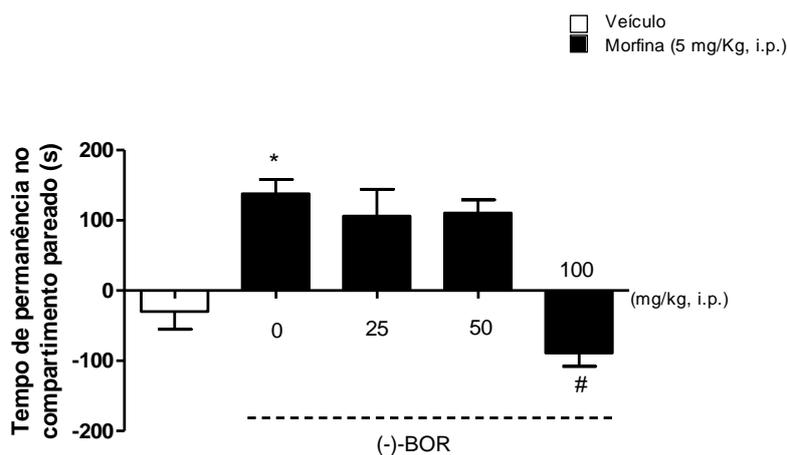
## Resultados

#### Efeito do (-) - BOR no paradigma do PCL

A **Figura 3** apresenta o efeito do (-) - BOR sobre o modelo de PCL por MOR. A administração de MOR (5 mg/kg, i.p) aumentou a preferência dos animais ao compartimento pareado em 137,6%; um valor significativo  $*p < 0,05$  em relação ao grupo

tratado com veículo. Já o pré-tratamento com (-) - BOR (100 mg/kg, i.p.) reduziu a preferência ao compartimento pareado em 64,6%; sendo significativo ( $^{\#}p<0,05$ ) em comparação com o grupo tratado com MOR.

**Figura 3.** Efeito da pré-administração de (-) - BOR (25, 50 e 100 mg/kg, i.p.) no PCL por MOR (5 mg/kg, i.p.).



**Legenda:** Os dados são expressos como média  $\pm$  E.P.M (n= 6 animais). \* $p<0,05$  para MOR (5 mg/kg, i.p) em relação ao grupo tratado com veículo e  $^{\#}p<0,05$  para o (-) - BOR (100 mg/kg, i.p.) em relação ao grupo MOR (ANOVA e Tukey como *post hoc* teste).

#### Efeito do (-) - BOR sobre sintomas de abstinência à MOR precipitada por naloxona

No modelo de abstinência à MOR desencadeada por naloxona, foi possível observar todos os sintomas de abstinência no grupo dos animais dependentes de MOR. Comportamentos como saltar ( $3,57\pm 0,48$ ), tremor de pata ( $3,3\pm 0,7$ ), agitação de cachorro molhado ( $3,14\pm 0,8$ ) e andar em marcha ré ( $1,0\pm 0,31$ ) foram significativos (\* $p<0,05$ ) em relação ao grupo que recebeu somente veículo e naloxona. Porém, o pré-tratamento com (-) - BOR (100 mg/kg, i.p.) reduziu significativamente ( $^{\#}p<0,05$ ) somente o comportamento de saltar ( $0,85\pm 0,26$ ), quando comparado com o grupo tratado com MOR (Tabela 1).

**Tabela 1.** Efeito do (-) - BOR (25, 50 e 100 mg/kg, i.p.) nos sintomas da síndrome de abstinência por MOR (5 mg/kg, i.p.) após a administração de naloxona (8 mg/kg, i.p.).

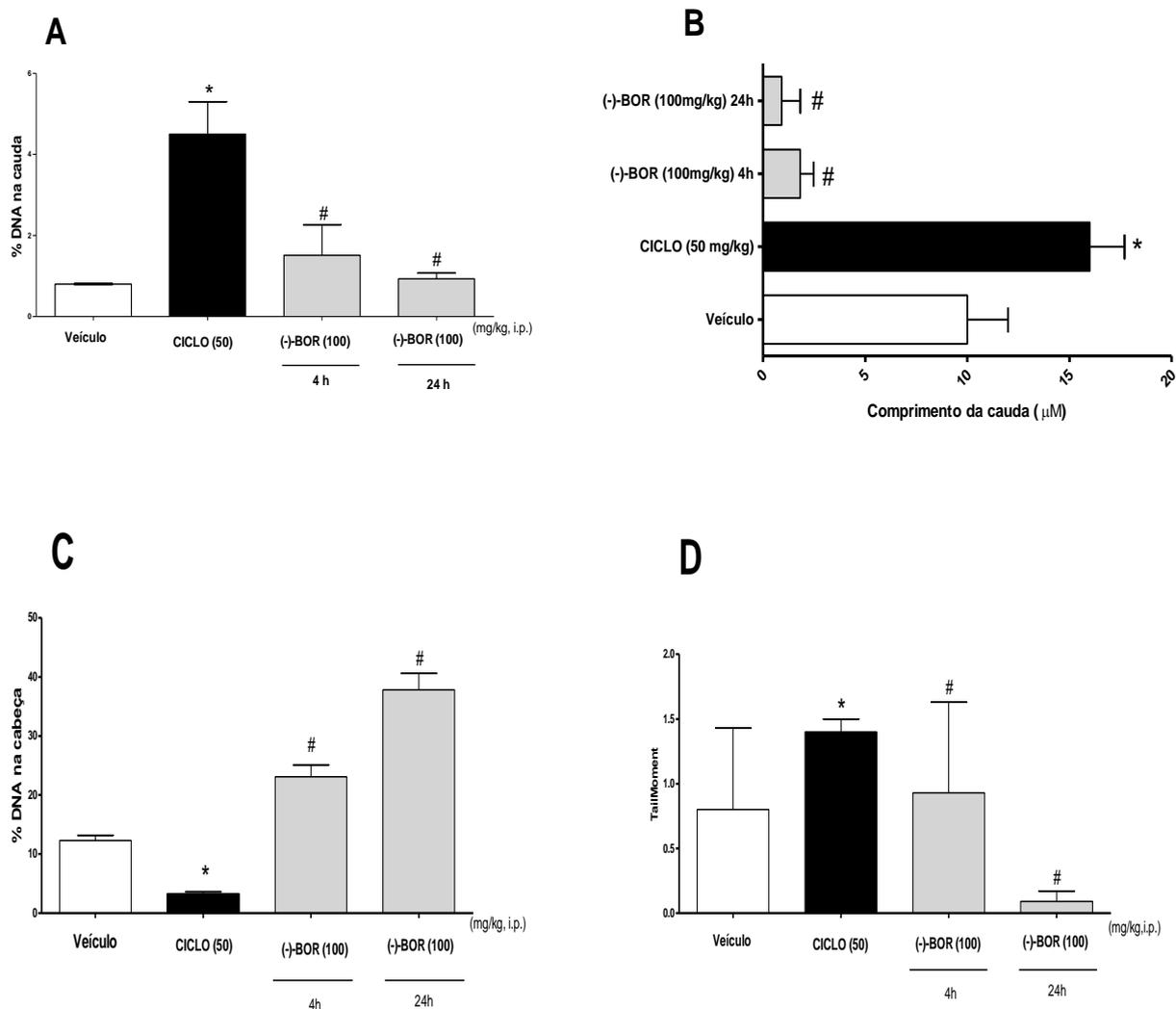
Sintomas de abstinência	Grupos (mg/kg, i.p.)				
	Veículo	MOR (5)	(-) - BOR+MOR (25)	(-) - BOR+MOR (50)	(-) - BOR+MOR (100)
Saltos	0,2 ± 0,2	3,57±0,48*	3,42±0,49	2,28±0,52	0,85±0,26 <sup>#</sup>
Tremor de pata	0,3±0,23	3,3±0,7*	3,1±0,3	3,0±0,8	2,2±0,9
Agitação de cachorro molhado	0,4±0,24	3,14±0,8*	2,28±0,52	2,4±0,29	3,0±0,72
Marcha ré	0,0±0,0	1,0±0,31*	0,57±0,29	0,28±0,18	0,28±0,18

**Legenda:** Os dados são expressos como média ± E.P.M. \* $p < 0,05$  significativo em comparação ao grupo veículo. <sup>#</sup> $p < 0,05$  significativo em comparação ao grupo MOR (ANOVA e Tukey como *post hoc* teste).

#### Avaliação genotóxica do (-)- BOR pelo ensaio do cometa

A avaliação do potencial genotóxico foi realizada através do teste do cometa com a dose de 100 mg/kg do (-) - BOR, já que foi a dose que apresentou efeito sobre o modelo de PCL e sobre a síndrome de abstinência por MOR. No ensaio do cometa foram avaliados 4 parâmetros: %DNA na cauda, comprimento da cauda ( $\mu\text{M}$ ), %DNA na cabeça e Tail moment (TM) em dois tempos, 4 e 24 horas após os tratamentos. Em todos os parâmetros avaliados é possível perceber que houve efeito significativo, ao compararmos os resultados do (-) - BOR em relação ao grupo controle CICLO (50 mg/kg, i.p.). Assim, o (-) - BOR reduz significativamente (<sup>#</sup> $p < 0,05$ ) a %DNA na cauda e o comprimento da cauda ( $\mu\text{M}$ ) após os tempos de 4 ( $1,51 \pm 0,76\%$ ;  $0,93 \pm 0,70 \mu\text{M}$ , respectivamente) e 24 horas ( $0,93 \pm 0,14\%$ ;  $0,09 \pm 0,08$ , respectivamente) em comparação ao CICLO ( $4,5 \pm 0,8\%$ ;  $16 \pm 2 \mu\text{M}$ ). Da mesma forma, seu efeito apresentou-se significativo (<sup>#</sup> $p < 0,05$ ) em relação aos outros dois parâmetros avaliados. O grupo tratado com (-) - BOR possui maior %DNA na cabeça e reduz o parâmetro Tailmoment nos tempos de 4 ( $23,12 \pm 1,93\%$ ;  $0,93 \pm 0,70$ , respectivamente) e 24 horas ( $37,8 \pm 2,82\%$ ;  $0,09 \pm 0,08$ , respectivamente) em relação ao grupo que recebeu CICLO ( $3,2 \pm 0,4\%$ ;  $1,4 \pm 0,1$ ) (**Figura 4**).

**Figura 4.** Avaliação genotóxica do (-) - BOR (100 mg/kg, i.p.) através do ensaio do cometa em sangue periférico de camundongos.



**Legenda:** (A) %DNA na cauda (B) comprimento da cauda (C) %DNA na cabeça e (D) Tailmoment. Os dados são expressos como média  $\pm$  E.P.M (n= 6) e \* $p < 0,05$  em relação aos grupos tratados com veículo e # $p < 0,05$  em comparação com o grupo CICLO (ANOVA e Tukey como post hoc teste).

## Discussão

Dada à importância que os opióides possuem no tratamento da dor moderada e crônica, reduzir efeitos adversos como tolerância a analgesia, dependência física e a adicção são um grande desafio para a pesquisa farmacológica moderna (YAYEH et al.,

2016). Existem vários modelos animais utilizados no estudo da dependência a opioides e outras drogas (LYNCH et al., 2010; PLANETA, 2013), o PCL é um dos mais empregados (ALAVI et al., 2016). O paradigma do PCL é um modelo utilizado com o objetivo de se compreender o mecanismo adictivo de diversas drogas tais como: os psicoestimulantes (AREZOOMANDAN et al., 2016; SHETTY; RUTLEDGE; FORSTER, 2016; WEN et al., 2007; ZHANG et al., 2016); canabinóides (BADALÀ; NOURI-MAHDAVI; RAOOF, 2008b; SAÑUDO-PEÑA et al., 1997) e opioides (CHALOVICH; EISENBERG, 2005; RECH; MOKLER; BRIGGS, 2012).

O modelo do PCL baseia-se na suposição de que associações positivas envolvendo um contexto ou estímulos específicos durante a administração de drogas com potencial adictivo ocorrem através de condicionamento Pavloviano. Na prática, funciona através de uma sobreposição temporal de sucessivos pareamentos do animal, sob efeito da droga, a um determinado compartimento (SHETTY; RUTLEDGE; FORSTER, 2016).

Diversos trabalhos demonstram a capacidade da MOR em desencadear PCL em roedores (NADAL et al., 2005; POPIK; DANYSZ, 1997; TERASHVILI et al., 2008; VAZQUEZ et al., 2006; WANG et al., 2007). O aumento da preferência ocorre através de aprendizado e memória, por intermédio da associação dos efeitos recompensadores da MOR ao compartimento pareado (MATTIOLI; TITOMANLIO; PERFUMI, 2012). Portanto, ao diminuir o PCL, o (-) - BOR reduz as propriedades reforçadoras da MOR interferindo na associação entre o ambiente e o efeito do opioide.

Uma das atividades farmacológicas relatadas do (-) - BOR é sua propriedade anticonvulsivante (QUINTANS-JÚNIOR et al., 2010), provavelmente, resultante da sua capacidade em modular positivamente os GABA<sub>A</sub>Rs (HALL et al., 2004) agindo como agonista parcial (GRANGER; CAMPBELL; JOHNSTON, 2005). Possivelmente o efeito sobre os GABA<sub>A</sub>Rs possa explicar, em parte, como o (-) - BOR reduz o PCL por MOR. O neurotransmissor inibitório GABA é crucial no desenvolvimento e manifestação do comportamento adictivo à opioides (JIAO et al., 2016; KELLY et al., 2014).

A cascata bioquímica que ativa o sistema recompensa inicia-se na área tegumentar ventral (ATV) e finaliza com a liberação de DA em receptores D2 localizados na membrana celular do hipocampo e *nucleus accumbens* (NAc) (CHEN; HOPF; BONCI, 2010). Em resumo, a cascata é desencadeada a partir da atividade excitatória da serotonina

(5-HT) que provoca a liberação de um tipo de peptídeo opióide endógeno a metaencefalina. Esse peptídeo, por sua vez, ao se ligar com receptores  $\mu$ , regula os neurônios GABAérgicos reduzindo sua atividade. A função do GABA é inibir a liberação de DA. Quando os neurônios contendo DA na ATV e de certas partes do hipocampo e da amígdala são desinibidos, a DA é liberada no NAc, o que permite a sensação de prazer finalizando a cascata (BLUM et al., 2014).

A modulação GABA em áreas do sistema mesocorticolímbico é importante no efeito reforçador da MOR e no desenvolvimento do PCL por MOR (SAHRAEI et al., 2005). Por exemplo, drogas análogas ao GABA como gabapentina e pregabalina, assim como o diazepam, um benzodiazepínico clássico e agonista dos GABA<sub>A</sub>Rs, reduzem tanto o desenvolvimento do PCL por MOR quanto à liberação de DA (ANDREWS et al., 2001; SUZUKI et al., 1995). Portanto, é possível que o (-) - BOR esteja potencializando a neurotransmissão GABAérgica e fortalecendo o efeito inibitório do GABA na cascata de neurotransmissores do sistema recompensa.

Além do efeito GABAérgico, SILVA-FILHO e colaboradores (2011) observaram que o (-) - BOR provoca vasorrelaxamento em aorta de ratos ao bloquear canais de  $Ca^{2+}$  ativados por voltagem ( $Ca_vL$ ). Esse mecanismo pode contribuir para o efeito do (-) - BOR no PCL por MOR. Por exemplo, fármacos como a nimodipina, verapamil e diltiazem antagonistas do  $Ca_vL$ , reduzem o desenvolvimento de PCL por MOR (VASEGHI; HAJHASHEMI; RABBANI, 2014; BIALA; WEGLINSKA, 2004).

A sinalização molecular da dependência à opioides envolve  $Ca^{2+}$  através do mecanismo que consiste em ativação da proteína quinase dependente de  $Ca^{2+}$ /calmodulina (CaMK II) desencadeando a fosforilação da proteína de resposta ligada ao cAMP (CREB) (AHMADI et al., 2013; BIAN; YU, 2015). O CREB é um fator de transcrição importante da formação de memória e sua ativação leva a alterações morfológicas de neurônios (ex. formação de mais espinhos ou degeneração de espinhos) (GAO et al., 2004). Portanto, também é possível que o pré-tratamento com (-) - BOR possa estar interferindo na disponibilização do  $Ca^{2+}$  diminuindo o seu influxo e conseqüentemente a sinalização da formação de memória associada ao compartimento pareado e o desenvolvimento do PCL por MOR.

Além disso, parece existir uma interação entre GABA e  $\text{Ca}^{2+}$ . Estudos têm sugerido que na formação da memória de longo prazo, a sinapse excitatória tanto no córtex como no hipocampo é modificada pela atividade GABAérgica sobre o  $\text{Ca}^{2+}$  (HAYAMA et al., 2013; MARSDEN et al., 2007; MEREDITH; FLOYER-LEA; PAULSEN, 2003). Tanto o córtex como o hipocampo são áreas ricas em interneurônios GABAérgicos e Glutamatérgicos. A ativação de receptores de glutamato do tipo NMDA faz com que ocorra influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  e despolarização da membrana celular contribuindo para a geração de potenciais de ação, fortalecendo alterações sinápticas de longo prazo. O GABA interfere na formação de memória de longo prazo ao reduzir o influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  e, portanto, a sinalização desencadeada pela ativação dos receptores NMDA na formação da memória (HIGLEY, 2016; MARSDEN et al., 2007).

A abstinência à opioides é um fenômeno complexo formado por muitos sinais e sintomas (BHALLA et al., 2002). É possível simular os sintomas de abstinência a opioides em modelo animal com a administração de antagonistas de receptores opioides (GOMAA; MOUSTAFA; FARGHALI, 1989). Comportamentos como o de saltar e a agitação do cachorro molhado são indicadores de abstinência à opioides podendo ser observados em animais (RAMESH et al., 2011). No aspecto clínico esses sintomas se correlacionam com tremores, agitação e nervosismo (KOSTEN; GEORGE, 2002; MOTAGHINEJAD et al., 2015). Dependentes de opioides são mais vulneráveis, que a população em geral, ao estresse e irritabilidade. Portanto, situações de estresse podem desencadear o craving em seres humanos (KOSTEN; GEORGE, 2002). Neste trabalho, o pré-tratamento com (-) - BOR foi capaz de amenizar o sintoma de saltar, que pode ser correlacionado com a agitação e a irritabilidade característicos da abstinência e craving à opióides. Algo positivo como característica para um fármaco que pode vir a ser utilizado como auxiliar na terapia da dor em pacientes que precisam de opioides como única alternativa.

Com intuito de avaliar a segurança do (-) - BOR realizamos o ensaio do cometa. O ensaio do cometa baseia-se na capacidade de fragmentos de DNA, carregados negativamente, serem arrastados através de um gel de agarose em resposta a um campo elétrico positivo. A extensão da migração do DNA depende, diretamente, dos danos no DNA presentes em cada célula. Quanto maior o arraste (cauda) maior o dano (GLEI, M.; SCHLÖRMANN, 2016; GUNASEKARANA; VICTOR; CHAND, 2015). Nos últimos

anos, o ensaio do cometa está sendo cada vez mais empregado para o estudo de segurança de novos produtos em diversas áreas como biologia molecular, farmacologia, toxicologia, genética e biotecnologia (GLEI, M.; SCHLÖRMANN, 2016). Para o ensaio do cometa é aconselhado utilizar, no mínimo, dois parâmetros para assegurar, ao máximo, credibilidade aos resultados (KUMARAVEL et al., 2009). No nosso trabalho, avaliamos a genotoxicidade do (-) - BOR através de quatro parâmetros e em todos o (-) - BOR apresentou dano ao DNA significativamente inferior aos danos causados por CICLO, seja no efeito agudo (4 horas depois) ou no tempo de reparo (24 horas depois da sua administração).

## Conclusões

Nosso estudo demonstrou que o (-) - BOR é capaz de interferir no desenvolvimento de PCL por MOR em camundongos. Além de reduzir a aquisição por MOR, o (-) - BOR demonstra ser capaz de amenizar o sintoma de saltar, relacionado clinicamente com agitação e irritabilidade em pacientes adictos à opioides. No que se refere à toxicidade, o (-) - BOR demonstrou ser uma molécula segura pois não apresentou efeito genotóxico em sangue periférico de camundongos. Esses resultados abrem a possibilidade de futuros trabalhos que visem o desenvolvimento do (-) - BOR como um fármaco útil em pacientes que precisam passar por tratamentos agudos e/ou crônicos com MOR diminuindo a possibilidade do desenvolvimento de adicção e irritabilidade durante o período de abstinência.

## Referências

- ADDOLORATO, G. et al. Novel therapeutic strategies for alcohol and drug addiction: focus on GABA, ion channels and transcranial magnetic stimulation. **Neuropsychopharmacology: official publication of the American College of Neuropsychopharmacology**, v. 37, n. 1, p. 163–77, 2012.
- AHMADI, S. et al. Gene Expression Profile of Calcium/Calmodulin-Dependent Protein Kinase II $\alpha$  in Rat's Hippocampus during Morphine Withdrawal. v. 4, n. 2, 2013.
- ALAVI, M. S. et al. The effect of O-1602, an atypical cannabinoid, on morphine-induced conditioned place preference and physical dependence. **Pharmacological Reports**, v. 68, n. 3, p. 592–597, 2016.

- ANDREWS, N. et al. Effect of gabapentin-like compounds on development and maintenance of morphine-induced conditioned place preference. **Psychopharmacology**, v. 157, n. 4, p. 381–387, 2001.
- AREZOOMANDAN, R. et al. Administration of activated glial condition medium in the nucleus accumbens extended extinction and intensified reinstatement of methamphetamine-induced conditioned place preference. **Brain Research Bulletin**, v. 125, p. 106–116, 2016.
- BADALÀ, F.; NOURI-MAHDAVI, K.; RAOOF, D. A. Genomewide association study of opioid dependence: multiple associations mapped to calcium and potassium pathways. **Biol Psychiatry**, v. 144, n. 5, p. 724–732, 2008a.
- BADALÀ, F.; NOURI-MAHDAVI, K.; RAOOF, D. A.  $\Delta$ 9-THC exposure attenuates aversive effects and reveals appetitive effects of K2/"Spice" constituent JWH-018 in mice. **Behav Pharmacol**, v. 144, n. 5, p. 724–732, 2008b.
- BHALLA, S. et al. Endothelin ETA Receptor Antagonist Reverses Naloxone-precipitated Opioid Withdrawal in Mice. **Clinical Science**, v. 103, p. 340–344, 2002.
- BIALA, G.; WEGLINSKA, B. Calcium channel antagonists attenuate cross-sensitization to the rewarding and/or locomotor effects of nicotine, morphine and MK-801. **The Journal of pharmacy and pharmacology**, v. 56, n. 8, p. 1021–8, 2004.
- BIAN, H.; YU, L. C. Intra-nucleus accumbens administration of the calcium/calmodulin-dependent protein kinase II inhibitor AIP induced antinociception in rats with mononeuropathy. **Neuroscience Letters**, v. 599, p. 129–132, 2015.
- BLONDELL, R. D.; AZADFARD, M.; WISNIEWSKI, A. M. Pharmacologic therapy for acute pain. **American Family Physician**, v. 87, n. 11, p. 766–772, 2013.
- BLUM, K. et al. Genetic Addiction Risk Score (GARS): Molecular Neurogenetic Evidence for Predisposition to Reward Deficiency Syndrome (RDS). **Molecular Neurobiology**, v. 50, n. 3, p. 765–796, 2014.
- CHALOVICH, J. M.; EISENBERG, E. Pavlovian conditioning of multiple opioid-like responses in mice. **Biophysical Chemistry**, v. 257, n. 5, p. 2432–2437, 2005.
- CHEN, B. T.; HOPF, F. W.; BONCI, A. Synaptic plasticity in the mesolimbic system. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1187, p. 129–139, 2010.
- DE GUGLIELMO, G. et al. Pioglitazone attenuates the opioid withdrawal and vulnerability to relapse to heroin seeking in rodents. **Psychopharmacology**, v. 234, n. 2, p. 223–234, 2017.
- FOWLER, J. S. et al. Imaging the addicted human brain. **Science & practice perspectives / a publication of the National Institute on Drug Abuse, National Institutes of Health**, v. 3, n. 2, p. 4–16, 2007.
- GAO, C. et al. Colocalization of phosphorylated CREB with calcium / calmodulin-dependent protein kinase IV in hippocampal neurons induced by ohmfentanyl stereoisomers. **Brain Research**, v. 1024, p. 25–33, 2004.

GAO, J.-L. et al. An-jun-ning, a traditional herbal formula, attenuates spontaneous withdrawal symptoms via modulation of the dopamine system in morphine-dependent rats. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 14, n. 1, p. 308, 2014.

GLEI, M., T. S.; SCHLÖRMANN, W. Comet assay : an essential tool in toxicological research. **Archives of Toxicology**, 2016.

GOMAA, A. A.; MOUSTAFA, S. A.; FARGHALI, A. A. Adenosine Triphosphate Blocks Opiate Withdrawal Symptoms in Rats and Mice. 1989.

GRAMAGE, E.; VICENTE-RODRÍGUEZ, M.; HERRADÓN, G. Pleiotrophin modulates morphine withdrawal but has no effects on morphine-conditioned place preference. **Neuroscience Letters**, v. 604, p. 75–79, 2015.

GRANGER, R. E.; CAMPBELL, E. L.; JOHNSTON, G. A. R. (+)- And (-) - BORneol: Efficacious positive modulators of GABA action at human recombinant GABAA receptors. **Biochemical Pharmacology**, v. 69, n. 7, p. 1101–1111, 2005.

HALL, A. C. et al. Modulation of human GABA A and glycine receptor currents by menthol and related monoterpenoids. **European Journal of Pharmacology**, v. 506, n. 1, p. 9–16, 2004.

HASANEIN, P.; TEIMURI, F. M.; EMAMJOMEH, A. Salvia officinalis L. attenuates morphine analgesic tolerance and dependence in rats: possible analgesic and sedative mechanisms. **Am.J Drug Alcohol Abuse**, v. 41, n. 1097–9891 (Electronic), p. 405–413, 2015.

HAYAMA, T. et al. GABA promotes the competitive selection of dendritic spines by controlling local Ca<sup>2+</sup> signaling. **Nature neuroscience**, v. 16, n. 10, p. 1409–16, 2013.

HIGLEY, M. J. Localized GABAergic inhibition of dendritic calcium signaling. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 8, n. 5, p. 583–592, 2016.

HU, X. et al. Curcumin attenuates opioid tolerance and dependence by inhibiting Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II alpha activity. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 352, n. 3, p. 420–428, 2015.

JIAO, D. L. et al. Involvement of dorsal striatal alpha1-containing GABAA receptors in methamphetamine-associated rewarding memories. **Neuroscience**, v. 320, n. February, p. 230–238, 2016.

KASTURE, S. et al. Withania somnifera prevents morphine withdrawal-induced decrease in spine density in nucleus accumbens shell of rats: A confocal laser scanning microscopy study. **Neurotoxicity Research**, v. 16, n. 4, p. 343–355, 2009.

KELLY R. TAN; UWE RUDOLPH; CHRISTIAN LÜSCHER. Hooked on benzodiazepines: GABAA receptor subtypes and addiction. **Trends Neurosci**, v. 34, n. 4, p. 188–197, 2014.

KOSTEN, T. R.; GEORGE, T. P. The neurobiology of opioid dependence: implications for treatment. **Science & practice perspectives / a publication of the National Institute on Drug Abuse, National Institutes of Health**, v. 1, n. 1, p. 13–20, 2002.

- KUMARAVEL, T. S. et al. Comet Assay measurements: A perspective. **Cell Biology and Toxicology**, v. 25, n. 1, p. 53–64, 2009.
- LI, C.-L. et al. Effects of inactivating the agranular or granular insular cortex on the acquisition of the morphine-induced conditioned place preference and naloxone-precipitated conditioned place aversion in rats. **Journal of Psychopharmacology**, v. 27, n. 9, p. 837–844, 2013.
- LISMAN, J. E.; GRACE, A. A. The hippocampal-VTA loop: Controlling the entry of information into long-term memory. **Neuron**, v. 46, n. 5, p. 703–713, 2005.
- LYNCH, W. J. et al. Animal models of substance abuse and addiction: Implications for science, animal welfare, and society. **Comparative Medicine**, v. 60, n. 3, p. 177–188, 2010.
- MANSOURI, M. T.; NAGHIZADEH, B.; GHORBANZADEH, B. Ellagic acid enhances morphine analgesia and attenuates the development of morphine tolerance and dependence in mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 741, p. 272–280, 2014.
- MARSDEN, K. C. et al. NMDA Receptor Activation Potentiates Inhibitory Transmission through GABA Receptor-Associated Protein- Dependent Exocytosis of GABA A Receptors. **Journal of Neuroscience**, v. 27, n. 52, p. 14326–14337, 2007.
- MASSALY, N.; MORÓN, J. A.; AL-HASANI, R. A Trigger for Opioid Misuse: Chronic Pain and Stress Dysregulate the Mesolimbic Pathway and Kappa Opioid System. **Frontiers in neuroscience**, v. 10, n. November, p. 480, 2016.
- MATTIOLI, L.; TITOMANLIO, F.; PERFUMI, M. Effects of a *Rhodiola rosea* L. extract on the acquisition, expression, extinction, and reinstatement of morphine-induced conditioned place preference in mice. **Psychopharmacology**, v. 221, n. 2, p. 183–193, 2012.
- MEREDITH, R. M.; FLOYER-LEA, A. M.; PAULSEN, O. Maturation of long-term potentiation induction rules in rodent hippocampus: role of GABAergic inhibition. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 23, n. 35, p. 11142–6, 2003.
- MOTAGHINEJAD, M. et al. Attenuation of morphine withdrawal syndrome by various dosages of curcumin in comparison with clonidine in mouse: Possible mechanism. **Iranian Journal of Medical Sciences**, v. 40, n. 2, p. 125–132, 2015.
- NADAL, R. et al. Perseverance of exploration in novel environments predicts morphine place conditioning in rats. **Behavioural Brain Research**, v. 165, n. 1, p. 72–79, 2005.
- PARVARDEH, S. et al. alpha-Terpineol attenuates morphine-induced physical dependence and Tolerance in Mice : Role of Nitric Oxide. **Iran J Basic Med Sci**, v. 19, n. 21, p. 201–208, 2016.
- PLANETA, C. S. Animal models of alcohol and drug dependence. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 35, n. SUPPL.2, p. 140–146, 2013.
- POPIK, P.; DANYSZ, W. Inhibition of reinforcing effects of morphine and motivational aspects of naloxone-precipitated opioid withdrawal by N-methyl-D-aspartate receptor

antagonist, memantine. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 280, n. 2, p. 854–865, 1997.

QUINTANS-JÚNIOR, L. J. et al. Carvacrol, borneol and citral reduce convulsant activity in rodents. **African Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 39, p. 6566–6572, 2010.

RAMESH, D. et al. Blockade of endocannabinoid hydrolytic enzymes attenuates precipitated opioid withdrawal symptoms in mice. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 339, n. 1, p. 173–85, 2011.

RECH, R. H.; MOKLER, D. J.; BRIGGS, S. L. Effects of combined opioids on pain and mood in mammals. **Pain Research and Treatment**, v. 2012, 2012.

SAHRAEI, H. et al. Different effects of GABAergic receptors located in the ventral tegmental area on the expression of morphine-induced conditioned place preference in rat. **European Journal of Pharmacology**, v. 524, n. 1–3, p. 95–101, 2005.

SAÑUDO-PEÑA, M. C. et al. Endogenous cannabinoids as an aversive or counter-rewarding system in the rat. **Neuroscience Letters**, v. 223, n. 2, p. 125–128, 1997.

SHETTY, R. A.; RUTLEDGE, M. A.; FORSTER, M. J. Retrograde conditioning of place preference and motor activity with cocaine in mice. **Psychopharmacology**, 2016.

SILVA-FILHO, J. C. et al. Investigation of Mechanisms Involved in (-) - BORneol-Induced Vasorelaxant Response on Rat Thoracic Aorta. **Basic & clinical pharmacology & toxicology**, p. 1–7, 2011.

SUZUKI, T. et al. Blockade of morphine-induced place preference by diazepam in mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 280, n. 3, p. 327–330, 1995.

TERASHVILI, M. et al. (+)-Morphine attenuates the (-)-morphine-produced conditioned place preference and the  $\mu$ -opioid receptor-mediated dopamine increase in the posterior nucleus accumbens of the rat. **European Journal of Pharmacology**, v. 587, n. 1–3, p. 147–154, 2008.

TRANG, T. et al. Pain and Poppies: The Good, the Bad, and the Ugly of Opioid Analgesics. **Journal of Neuroscience**, v. 35, n. 41, p. 13879–13888, 2015.

VARRASSI, G.; MÜLLER-SCHWEFE, G. H. H. The international CHANGE PAIN physician survey: does specialism influence the perception of pain and its treatment? **Current medical research and opinion**, v. 28, n. 5, p. 823–31, 2012.

VAZQUEZ, V. et al. Brief early handling increases morphine dependence in adult rats. **Behavioural Brain Research**, v. 170, n. 2, p. 211–218, 2006.

VOLKOW, N. D. et al. Medication-Assisted Therapies — Tackling the Opioid- Overdose Epidemic. **New England Journal of Medicine**, v. 370, n. 22, p. 2061–2063, 2014.

WANG, W. et al. The effect of l-stepholidine, a novel extract of Chinese herb, on the acquisition, expression, maintenance, and re-acquisition of morphine conditioned place preference in rats. **Neuropharmacology**, v. 52, n. 2, p. 355–361, 2007.

WEN, B. et al. Effect of fendiline on the maintenance and expression of methamphetamine-induced conditioned place preference in Sprague-Dawley rats.

**Psychopharmacology (Berl)**, v. 454, n. 1, p. 42–54, 2007.

YAYEH, T. et al. Morphine dependence is attenuated by red ginseng extract and ginsenosides Rh2, Rg3, and compound K. **Journal of Ginseng Research**, v. 40, n. 4, p. 445–452, 2016.

ZHANG, L. et al. Cocaine-induced synaptic structural modification is differentially regulated by dopamine D1 and D3 receptors-mediated signaling pathways. **Addiction Biology**, p. 1–14, 2016.

ZHANG, Y.; LOH, H. H.; LAW, P. Y. Effect of Opioid on Adult Hippocampal Neurogenesis. **Scientific World Journal**, v. 2016, n. Dcx, 2016.



### **CAPÍTULO III:**

**Efeito neuroprotetor do (-) - Borneol sobre a fragmentação de DNA induzida por morfina no córtex pré-frontal e hipocampo de camundongos**

## **Efeito neuroprotetor do (-) - Borneol sobre a fragmentação de DNA induzida por morfina no córtex pré-frontal e hipocampo de camundongos**

### **RESUMO**

A morfina (MOR) é um dos opióides de escolha no tratamento da dor moderada e grave. Porém, a administração prolongada de MOR pode resultar em problemas adversos graves como tolerância e adicção. A administração de MOR é capaz de provocar neurotoxicidade em áreas mesolímbicas como hipocampo e Córtex Pré-Frontal (CPF), resultando no hipofuncionamento dessas áreas. O (-) - Borneol [(-) - BOR] é um monoterpeneo bicíclico com grande aplicação nas indústrias alimentícia, cosmética e farmacêutica. Em estudos de isquemia em neurônios corticais sob privação de oxigênio-glucose seguido de reperfusão induzida por bloqueio de carótida em *Rattus norvegicus* o (-) - BOR apresenta atividade neuroprotetora. Esse trabalho teve o objetivo de avaliar o efeito do (-) - BOR sintético na fragmentação de DNA induzida por MOR em hipocampo e CPF de camundongos *Swiss webster* adultos. O efeito neuroprotetor do (-) - BOR foi avaliado através do teste do cometa em amostras de hipocampo e CPF de camundongos. A pré-administração de (-) - BOR (100 mg/kg, i.p.) reduziu a fragmentação de DNA na cauda da amostra de hipocampo e na amostra de CPF; assim como o comprimento da cauda e o Tailmoment no hipocampo e CPF. Além disso, a pré-administração de (-) - BOR não interfere na atividade da enzima Lactato Desidrogenase (LDH), enzima envolvida com o processo necrótico de células. Portanto, o (-) - BOR apresentou um efeito neuroprotetor sobre a fragmentação de DNA induzida por MOR possibilitando o planejamento de uma nova droga que pode ser associado aos tratamentos agudos e crônicos com o opioide.

**Palavras-chave:** (-) - Borneol. Córtex pré-frontal. Hipocampo. Morfina. Neuroproteção. Teste do Cometa.

## ABSTRACT

Morphine (MOR) is the opioid of choice in treatment of moderate and severe pain. However, prolonged administration of MOR can result in serious adverse conditions such as tolerance and addiction. MOR administration can cause neurotoxicity in mesolimbic areas such as hippocampus and prefrontal cortex (PFC) resulting in hypofunctioning of these areas. (-) - Borneol [(-) - BOR] is a bicyclic monoterpene with great application in the food, cosmetic and pharmaceutical industries. In studies of ischemia in cortical neurons under oxygen deprivation-glucose followed by reperfusion induced by carotid blockade in *Rattus norvegicus* the (-) - BOR shows neuroprotective activity. The objective of this work was to evaluate the effect of synthetic (-) - BOR on the DNA fragmentation induced by MOR in hippocampus and PFC of adult *Swiss webster* mice. The neuroprotective effect of (-) - BOR was evaluated through the comet assay in hippocampus and PFC of mice. Pre-administration of (-) - BOR (100 mg/kg, i.p.) reduced the % of tail DNA in the hippocampus and PFC. As well as tail length and tailmoment in hippocampus and PFC. In addition, pre-administration of (-) - BOR does not interfere with Lactate Dehydrogenase (LDH) activity, enzyme involved in the necrotic cell process. Therefore, (-) - BOR showed a neuroprotective effect on MOR-induced DNA fragmentation making possible the planning a new drug that can be associated with acute and chronic treatments with the opioid.

**Keywords:** (-) - Borneol. Prefrontal cortex. Hippocampus. Morphine. Neuroprotection. Comet assay.

## Introdução

A morfina (MOR) é um dos opioides de escolha no tratamento da dor moderada e grave (VOLKOW et al., 2014). Porém, a administração prolongada de MOR pode resultar em problemas adversos graves como tolerância e adicção (BLONDELL; AZADFARD; WISNIEWSKI, 2013). O mecanismo da adicção a opioides resulta da ativação de receptores opioides do tipo  $\mu$ ,  $\delta$  e  $\kappa$  presentes em interneurônios (ex. GABAérgicos ou Glu) moduladores da transmissão dopaminérgica na Área Tegmentar Ventral (ATV) e *Nucleus Accumbens* (NAc) (KOSTEN; GEORGE, 2002). Interneurônios, como os GABAérgicos, inibem a transmissão dopaminérgica funcionando como um “freio” sináptico. Ao se ligar nos receptores do tipo  $\mu$ , a MOR suprime o efeito inibitório dos interneurônios GABA, pois a ativação das proteínas G (Gi/o) inibe a enzima Adenilato ciclase (AC) e o influxo de cálcio para o interior da célula, promovendo a ativação dos canais de potássio e conseqüentemente hiperpolarizando a membrana dos interneurônios GABA. Como consequência ocorre um aumento da quantidade de DA no NAc (NESTLER, 2005; TRAYNOR, 2012; MORGAN; CHRISTIE, 2011).

Os sintomas de abstinência por MOR e outros opioides são caracterizados por disforia, náuseas ou vômitos, dores musculares, lacrimejamento, rinorreia, dilatação da pupila, piloereção, sudorese, diarreia, bocejos, febre e insônia (dependência física), sintomas responsáveis pelo seu reforço negativo (LIU et al., 2013). A administração de MOR é capaz de provocar neurotoxicidade em áreas mesolímbicas como hipocampo e Córtex Pré-Frontal (CPF) (MILLER et al., 2012; SKLAIR-TAVRON et al., 1996), resultando no hipofuncionamento dessas áreas.

Teorias adictivas apontam para a importância da descompensação de áreas mesocorticolímbicas como o hipofuncionamento do CPF, responsável por pensamentos lógicos e por “filtrar” impulsos característicos da síndrome de abstinência por opioides e na precipitação do *craving* no desenvolvimento da adicção a drogas (GEORGE; KOOB, 2013; VOLKOW et al., 2013). Assim, o estudo da neuroproteção de áreas como o CPF e hipocampo é uma importante estratégia na busca por moléculas que possam ser úteis no tratamento da adicção a drogas.

O (-) - Borneol [(-) - BOR] é um monoterpene bicíclico com grande aplicação nas indústrias alimentícia, cosmética e farmacêutica, pode ser obtido a partir de óleos essenciais de plantas medicinais (ex. *Matricaria recutita* L e *Valeriana officinalis* L) (PIERONI et al., 2002; MIRABI et al., 2011) ou como produto sintético (CHEN et al., 2014). O estudo farmacocinético dessa substância demonstra que sua distribuição no Sistema Nervoso Central (SNC) ocorre em áreas mesolímbicas que compõem o sistema recompensa (FOWLER et al., 2007; LISMAN; GRACE, 2005) importantes no desenvolvimento de dependência à opioides (KOSTEN; GEORGE, 2002; MASSALY; MORÓN; AL-HASANI, 2016; TRANG et al., 2015; ZHANG; LOH; LAW, 2016).

Dentre as atividades farmacológicas atribuídas ao (-) - BOR encontra-se o seu efeito como agonista parcial sobre receptores do ácido-gama-aminobutírico-A (GABA<sub>A</sub>R) (GRANGER; CAMPBELL; JOHNSTON, 2005), neurotransmissor importante na cascata bioquímica da adicção à opioides (TRANG et al., 2015) e como um antagonista do influxo de Ca<sup>2+</sup> (SILVA-FILHO et al., 2011) íon necessário na sinalização da formação da memória de longo prazo (BADALÀ; NOURI-MAHDAVI; RAOOF, 2008). Tanto a ativação do GABA quanto o bloqueio dos canais de Ca<sup>2+</sup> são estratégias promissoras no desenvolvimento de novos fármacos na terapia da adicção as drogas (ADDOLORATO et al., 2012). Em estudos de isquemia em neurônios corticais sob privação de oxigênio-glucose seguido de reperfusão induzida por bloqueio de carótida em *Rattus norvegicus* o (-) - BOR apresenta atividade neuroprotetora (LIU et al., 2011; KONG et al., 2014).

Com base nos dados presentes na literatura, o (-) - BOR torna-se uma molécula promissora na busca por fármacos úteis na terapia de adicção a opioides. Esse trabalho teve o objetivo de avaliar o efeito do (-) - BOR sintético na fragmentação de DNA induzida por morfina em hipocampo e CPF de camundongos *Swiss Webster* adultos.

## Material e métodos

### Animais

Foram utilizados camundongos *Swiss*, machos (25-30 g), provenientes do Biotério do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Piauí (CCA/UFPI), mantidos

sob condições controladas de temperatura ( $22 \pm 2$  °C) e umidade relativa ( $45 \pm 2\%$ ) em um ciclo claro-escuro de 12/12 horas com livre acesso à comida e água. Os animais foram aclimatados por um período de 7 dias antes do início dos protocolos experimentais. Os protocolos utilizados foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA/UFPI) sob o nº 083/14 e todos os esforços foram realizados na tentativa de minimizar o sofrimento dos animais.

## Drogas

O (-) - BOR foi adquirido da empresa Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA) e a MOR obtida a partir da Cristália (São Paulo, SP, Brasil). O (-) - BOR foi previamente solubilizado em dimetilsulfóxido (DMSO a 1%) e em seguida diluído em solução salina (NaCl a 0,9%). As outras drogas foram dissolvidas em NaCl 0,9%.

## Protocolos experimentais

### *Tratamento com MOR*

Camundongos *Swiss*, machos (25-30 g), 6 por grupo, foram tratados com: veículo, MOR (5 mg/kg, i.p.) e (-) - BOR (25, 50 e 100 mg/kg, i.p.) trinta minutos antes da administração de MOR durante 5 dias consecutivos. Ao final do protocolo, os animais foram decapitados, os cérebros foram removidos e as áreas do CPF e o hipocampo foram dissecados e rapidamente transferidos para solução de HBSS/EDTA zero- $\text{Ca}^{2+}$ , mantida em gelo.

### *Efeito do (-) - BOR sobre a fragmentação de DNA por MOR*

Coletou-se 40  $\mu\text{L}$  de amostra do CPF e hipocampo dissecados após o tratamento com MOR, transferindo-os para microtubos contendo 120  $\mu\text{L}$  de *low melting-point* agarose (1,5%) a 37 °C. A mistura foi homogeneizada e transferida para lâminas pré-cobertas com agarose e armazenadas a 4 °C por 30 minutos (SILVA; SANTOS; TAKAHASHI, 2010), numa temperatura de 4 °C com duração de 15 minutos em ambiente escuro. Em seguida, as lamínulas foram removidas e imersas em cubetas

verticais de vidro contendo solução de lise com NaCl (2,5 M); EDTA (100 mM) e 1,2 g de TRIS (10 mM). No momento do uso, foi adicionado 1% de Triton X-100 e 10% de DMSO. As lâminas foram postas em uma cuba contendo tampão de eletroforese pH > 13,0 NaOH (300 mM) e EDTA (1mM), preparada a partir de uma solução estoque de NaOH (10 N) e EDTA (200 mM, pH 10,0), permanecendo em repouso por 20 minutos. A “corrida” eletroforética foi realizada com 25 V e 300 mA

Após a eletroforese, as lâminas foram retiradas da cuba e mergulhadas na solução de neutralização (0,4 M tris; pH 7,5 por 5 min). Este processo foi repetido por 3 vezes. Por fim, foram lavadas com água destilada e secas, corando-as com GelRed (diluição 2,0: 10.000  $\mu$ L por 10 minutos). Todas as lâminas foram analisadas em microscópio de imunofluorescência (aumento de 40X), equipado com filtro de excitação (420-490 nm) e filtro de barreira (520 nm). As imagens foram obtidas por um sistema OPTON (Câmera digital CCD 5.0 megapixels para imunofluorescência). Avaliou-se o dano ao DNA, através da medida do percentual de DNA presente na cauda (% DNA - proporção do DNA total presente na cauda da amostra de hipocampo e CPF), o comprimento da cauda ( $\mu$ M) e o momento da cauda (TM- comprimento da cauda vezes o percentual do DNA na cauda) (KUMARAVEL et al., 2009). Os parâmetros foram calculados sobre 100 nucleóides/amostra (duas lâminas por indivíduo) e para isso, utilizou-se o software OpenComet® (GYORI et al., 2014).

### *Cultura primária de neurônios*

Amostras do CPF e hipocampo foram centrifugadas (2 min/1500 rpm/10 °C) e lavadas por duas vezes em meio HBSS/EDTA ZERO-Ca<sup>2+</sup>. Após a última lavagem, acrescentou-se 500  $\mu$ L de solução de tripsina (0,25% em HBSS/EDTA) em cada tubo e levou-se ao banho maria (37 °C, ~30 min). Após este período, adicionou-se 1,5 mL de meio Meio Dulbecco MEM (DMEM) suplementado com 10% de Soro Bovino Fetal (SBF) e 1% antibióticos (penicilina/estreptomicina) e então as amostras foram submetidas à dissociação mecânica, utilizando-se pipetas Pasteur de vidro polidas e de diâmetros variados. Após a dissociação, as amostras foram centrifugadas (5 min/2000 rpm/10 °C), sendo então, ressuspensas em 1 mL de meio DMEM suplementado. As células foram contadas em câmara de Neubauer e tiveram sua viabilidade previamente determinada por

coloração em azul de Tripán (>90%) antes do plaqueamento. Foram utilizadas placas de 96 poços para plaqueamento das células, as quais foram incubadas em estufa biológica (37 °C/5% CO<sub>2</sub>) por 6 horas antes dos experimentos. Todos os procedimentos de cultura primária foram realizados em ambiente estéril no interior de cabine de segurança biológica A2 (GONÇALVES et al., 2013).

#### *Efeito do (-) - BOR sobre atividade da enzimática Lactato Desidrogenase (LDH)*

Após o plaqueamento os poços foram divididos em veículo, controle positivo, MOR, (-) - BOR + MOR. Foram administrados 50 µl de veículo no poço controle e MOR (10<sup>-6</sup> mM). As células tratadas com (-)- BOR, receberam, trinta minutos antes da administração de MOR, 50 µl de (-) - BOR (1 mM). Após a administração das drogas, as células foram incubadas por diferentes tempos (12 e 24 horas) em estufa de CO<sub>2</sub> a 37 °C. Terminado o tempo de incubação, as células foram retiradas da estufa, sendo coletado, então, o sobrenadante. O sobrenadante foi centrifugado (5 minutos, 2500 rpm) em tubos de 1 mL. Por fim, foi recolhido 100 µL de sobrenadante para o ensaio de LDH. Ao sobrenadante foi acrescentado 100 µl do kit LDH (Labtest<sup>®</sup>), sendo incubado em estufa (5 minutos, 37 °C). A reação foi analisada em espectrofotômetro (340 λ). As amostras foram feitas em triplicata (CHAN; MORIWAKI; ROSA, 2009).

#### *Análise estatística*

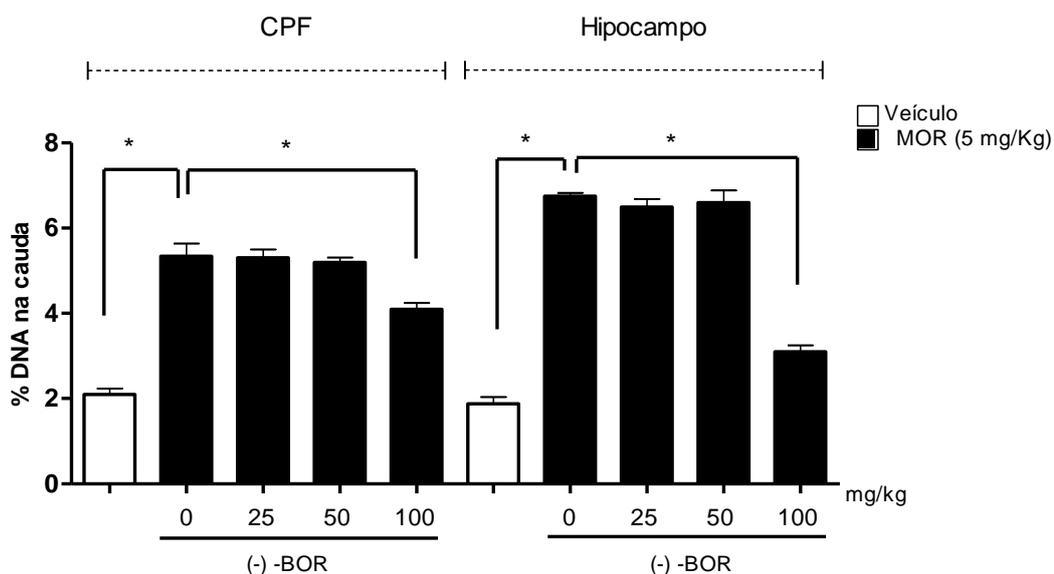
Os valores foram expressos como média ± erro padrão da média (E.P.M.). As diferenças entre os grupos foram determinadas por meio de Análise de Variância (ANOVA), seguida por Tukey como *post hoc* teste. Os valores foram considerados significativos quando \**p* < 0.05. Todas as análises foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism, versão 6.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, EUA).

## **Resultados**

#### *Efeito do (-) - BOR sobre a fragmentação de DNA por MOR*

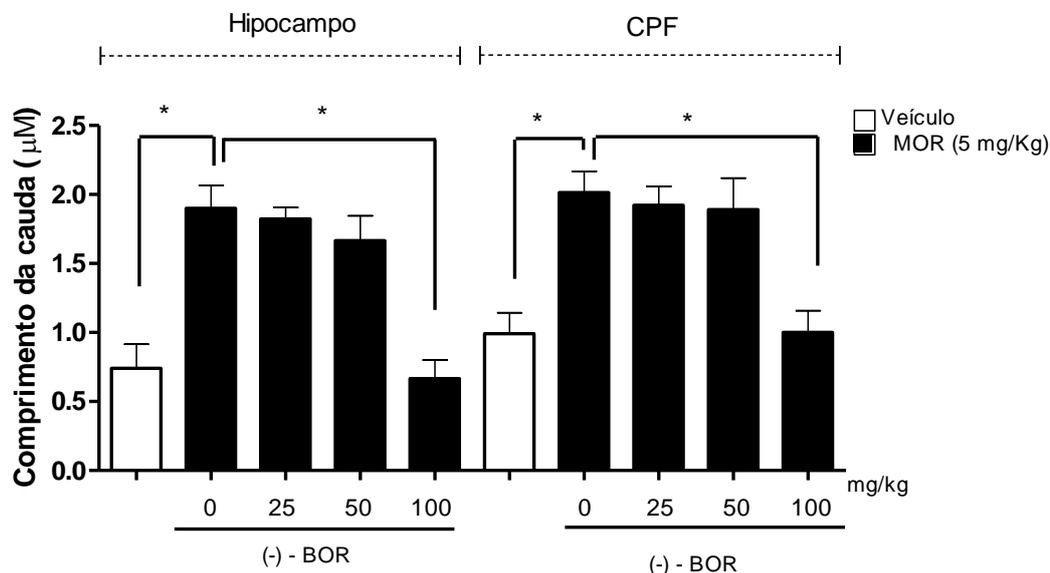
O efeito neuroprotetor do (-) - BOR foi avaliado através do teste do cometa. O dano sobre o DNA foi medido a partir dos seguintes parâmetros: % de DNA na cauda; comprimento da cauda (CC) e “Tail Moment” (TM) do DNA de hipocampo e CPF de camundongos. Assim, na **Figura 1**, é possível perceber a diferença significativa ( $*p < 0.05$ ) entre o dano no DNA induzido por MOR no CPF e hipocampo (% de DNA na cauda =  $5,3 \pm 4,2$  e  $6,7 \pm 1,1$ ; respectivamente), como também, a redução significativa ( $*p < 0,05$ ) do dano ao DNA na amostra do CPF (% de DNA na cauda =  $4,1 \pm 2,1$ ) e hipocampo (% de DNA na cauda =  $3,1 \pm 2,1$ ; respectivamente) com a administração prévia de 100 mg/kg, i.p. de (-) - BOR. De forma similar as **Figuras 2 e 3** mostram que o (-) - BOR (100 mg/kg, i.p.) reduz o CC no hipocampo e CPF ( $0,6 \pm 2,0$  e  $1,0 \pm 2,2$ , respectivamente) e o TM no hipocampo e CPF ( $0,53 \pm 2,1$  e  $0,68 \pm 2,3$ , respectivamente) de forma significativa ( $*p < 0,05$ ) quando comparados ao CC no hipocampo e CPF ( $1,89 \pm 2,4$  e  $2 \pm 2,2$ ; respectivamente) e TM no hipocampo e CPF ( $1,35 \pm 2,3$  e  $2 \pm 1,6$ ) do grupo tratado com 5mg/kg (i.p.) de MOR.

**Figura 1.** Efeito da pré-administração de (-) - BOR (25, 50 e 100 mg/kg, i.p.) no dano ao DNA induzido por MOR (5mg/kg, i.p.) em hipocampo e CPF de camundongos pelo parâmetro de % de DNA na cauda.



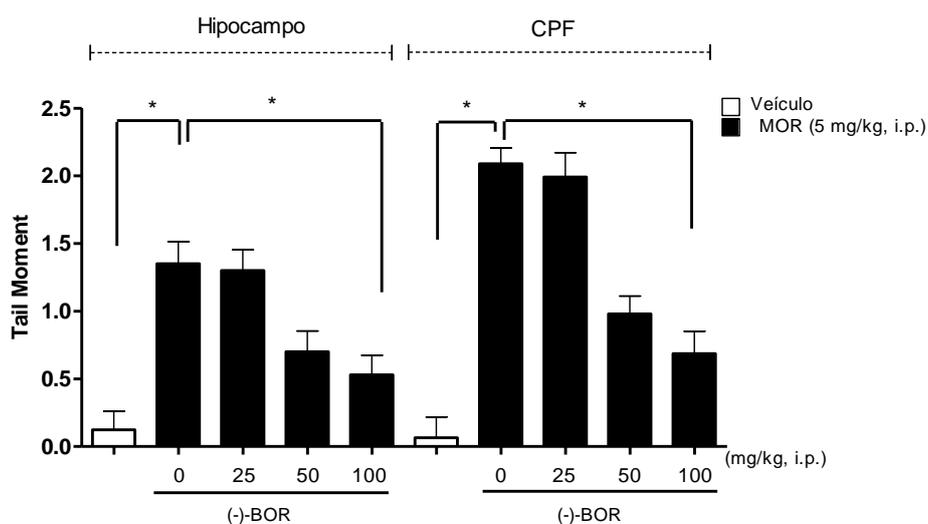
**Legenda:** Os dados são expressos como média  $\pm$  E.P.M (n= 6).  $*p < 0,05$  em relação aos grupos tratados com veículo ou MOR (ANOVA e Tukey como post hoc teste).

**Figura 2.** Efeito da administração de (-) - BOR (25, 50 e 100 mg/kg, i.p.) no dano ao DNA induzido por MOR (5mg/kg, i.p.) em hipocampo e CPF de camundongos pelo parâmetro de comprimento de cauda (CC) do DNA.



**Legenda:** Os dados são expressos como média ± E.P.M (n= 6). \* $p < 0,05$  em relação aos grupos tratados com veículo ou MOR (ANOVA e Tukey como post hoc teste).

**Figura 3.** Efeito da administração de (-) - BOR (25, 50 e 100 mg/kg, i.p.) no dano ao DNA induzido por MOR (5 mg/kg, i.p.) em hipocampo e CPF de camundongos pelo parâmetro Tail moment (TM).

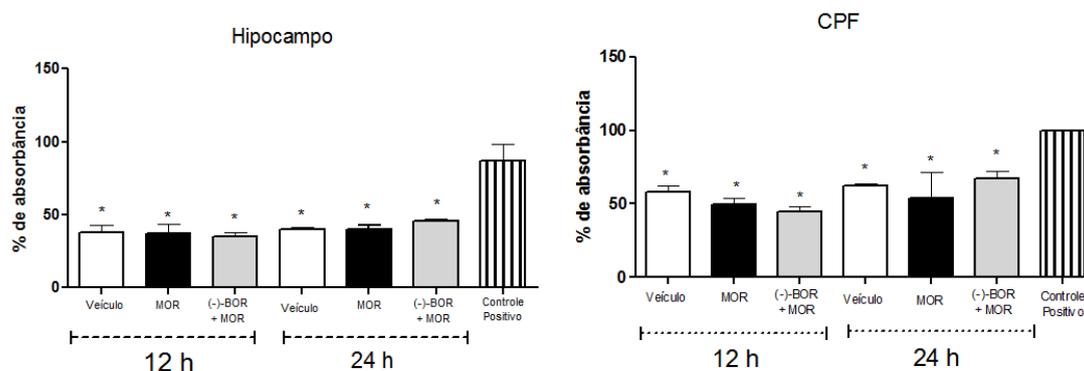


**Legenda:** Os dados são expressos como média ± E.P.M (n= 6). \* $p < 0,05$  em relação aos grupos tratados com veículo ou MOR (ANOVA e Tukey como post hoc teste).

### Efeito do (-)- BOR sobre a atividade da enzimática Lactato Desidrogenase (LDH)

Na **Figura 4**, é possível observar que a administração de MOR e a pré-administração de (-) - BOR na cultura primária de células de hipocampo e CPF de camundongos reduzem a atividade da enzima LDH nos tempos de 12 horas (70% e 63%; 64% e 53%, respectivamente) e 24 horas (56% e 50%; 40% e 25%; respectivamente).

**Figura 4.** Efeito da administração de 50  $\mu$ l de (-) - BOR (1 mM) e MOR ( $10^{-6}$  mM) na atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH) em cultura primária de células de hipocampo e CPF de camundongos.



**Legenda:** Os dados são expressos como média  $\pm$  E.P.M (n= 6). \* $p < 0,05$  em relação ao grupo controle positivo (ANOVA e Tukey como *post hoc* teste).

### Discussão

Um efeito relacionado ao uso crônico de MOR é a indução de dano ao DNA e apoptose em células neurais (HU et al., 2002; MAO et al., 2002). Diversos fármacos causam gentoxicidade (LI; LIN, 1998), dentre estes a MOR é capaz de provocar danos no DNA com 4 dias de uso contínuo (WANG et al., 2009). Katebi e colaboradores (2013) verificaram que a dose de 5 mg/kg de MOR é capaz de desencadear apoptose no CPF e hipocampo de ratos. Na célula, a fragmentação de DNA pode ser observada através de técnicas específicas como o ensaio do cometa, um dos métodos mais utilizados para detectar microscopicamente danos no DNA (KUMARAVEL et al., 2009).

O ensaio do cometa baseia-se na capacidade de fragmentos de DNA, carregados negativamente, serem arrastados através de um gel de agarose em resposta a um campo eléctrico positivo. A extensão da migração do DNA depende, diretamente, dos danos no DNA presentes em cada célula. Quanto maior o arraste (cauda) maior o dano (GLEI, M.; SCHLÖRMANN, 2016; GUNASEKARANA; VICTOR; CHAND, 2015). No nosso estudo, observamos através do ensaio do cometa, que o pré-tratamento com (-) - BOR reduz, significativamente, o nível de danos ao DNA induzido por MOR nos três parâmetros utilizados: %DNA na cauda, CC e TM. Possivelmente a MOR é capaz de desencadear danos ao DNA por duas vias. A primeira ocorreria por intermédio da família de proteínas Bcl e caspase e a segunda seria mediada por radicais livres (BORONAT; GARCÍA-FUSTER; GARCÍA-SEVILLA, 2001; HU et al., 2002; SKRABALOVA; DRASTICHOVA; NOVOTNY, 2013).

Logo, no CPF e hipocampo de ratos a MOR aumenta os fatores apoptóticos Bax e caspase-3 e diminui a expressão do fator anti-apoptótico Bcl-2 (BORONAT; GARCÍA-FUSTER; GARCÍA-SEVILLA, 2001; KATEBI et al., 2013). O Bcl-2, fisiologicamente, inibe o processo prevenindo a despolarização da membrana mitocondrial, enquanto que o Bax promove o dano ao DNA por intermédio da despolarização da membrana mitocondrial e liberação do citocromo C (ELMORE, 2007). Outro estudo demonstra que o tratamento, *in vitro*, de células neurais humanas com  $10^{-6}$  M de MOR aumenta a fragmentação do DNA e a atividade de caspase-3 (HU et al., 2002).

O segundo mecanismo neurotóxico pode ser observado após o tratamento crônico com MOR e o conseqüente aumento de produção de radicais livres somado a redução na atividade de diferentes componentes de sistemas antioxidantes na célula (SKRABALOVA; DRASTICHOVA; NOVOTNY, 2013). Espécies reativas de oxigênio (EROs) promovem uma cascata bioquímica que culmina com a ativação de TNF- $\alpha$  e fragmentação do DNA. O Bcl-2 atua como um antioxidante bloqueando a cascata ativada por EROs. Durante a fragmentação de DNA induzida pelo TNF- $\alpha$ , que envolve sinalização por EROs, o Bcl-2 impede a acumulação de EROs e os eventos subsequentes, como a despolarização da membrana mitocondrial, expressão de Bax, liberação de citocromo C, ativação de caspases e fragmentação de DNA (FLEURY; MIGNOTTE; VAYSSIÈRE, 2002).

O efeito neuroprotetor que observamos com o (-) - BOR condiz com outros trabalhos encontrados na literatura. Por exemplo, a mistura racêmica do borneol apresenta atividade antioxidante em hepatócitos e células testiculares de ratos ao diminuir a genotoxicidade por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (HORVÁTHOVÁ et al., 2009). Tanto o (+)- e o (-) - BORneol aumentam a expressão de fatores anti-apoptóticos e reduzem a expressão dos pró-apoptóticos aumentando a razão Bcl-2/Bax e como resultado, previnem a liberação do citocromo C em células SH-SY5Y (HUR et al., 2013). Em modelo de isquemia por privação de oxigênio e glicose seguido por reperfusão em células de córtex de ratos recém-nascidos, LIU e colaboradores (2011) observaram que a elevação de óxido nítrico (ON) e a superexpressão da enzima Óxido Nítrico Sintase (iONS) são reduzidos por Borneol. O mecanismo de neuroproteção, proposto pelos autores, seria por regulação da via iONS/ON, inibição de fatores inflamatórios (I $\kappa$ B $\alpha$ -NF $\kappa$ B) e de caspase (LIU et al., 2011). Portanto, o (-) - BOR parece agir sobre as duas vias neurotóxicas desencadeadas pela MOR. Esse efeito sobre a fragmentação de DNA por MOR seria um mecanismo que resultaria em um provável efeito antiapoptótico, pois nos tempos 12 e 24 horas, a MOR não altera a atividade da enzima LDH, envolvida no processo de morte celular por necrose (CHAN; MORIWAKI; ROSA, 2009).

## Conclusões

Os resultados obtidos neste trabalho indicam que o (-) - BOR é capaz de reduzir a fragmentação de DNA induzida por MOR e com isso, impedir a etapa inicial que levaria ao processo apoptótico de áreas mesolímbicas como o hipocampo e CPF. Assim, o (-) - BOR pode vir a ser planejado com um fármaco que poderia auxiliar o tratamento de pacientes com dor crônica e que necessitam de terapia com MOR e assim prevenir lesões neurotóxicas em áreas importantes do SNC como o hipocampo e o CPF.

## Referências

ADDOLORATO, G.; LEGGIO, L.; HOPF, F. W.; DIANA, M.; BONC, A. Novel therapeutic strategies for alcohol and drug addiction: focus on GABA, ion channels and transcranial magnetic stimulation. **Neuropsychopharmacology : official publication of**

- the American College of Neuropsychopharmacology**, v. 37, n. 1, p. 163–77, 2012.
- BLONDELL, R. D.; AZADFARD, M.; WISNIEWSKI, A. M. Pharmacologic therapy for acute pain. **American Family Physician**, v. 87, n. 11, p. 766–772, 2013.
- BORONAT, M. A.; GARCÍA-FUSTER, M. J.; GARCÍA-SEVILLA, J. A. Chronic morphine induces up-regulation of the pro-apoptotic Fas receptor and down-regulation of the anti-apoptotic Bcl-2 oncoprotein in rat brain. **British journal of pharmacology**, v. 134, n. 6, p. 1263–70, 2001.
- CHAN, F. K.-M.; MORIWAKI, K.; ROSA, M. J. DE. Detection of Necrosis by Release of Lactate Dehydrogenase (LDH) Activity. **Methods in Molecular Biology**, v. 531, n. 1, p. 588, 2009.
- ELMORE, S. Apoptosis: a review of programmed cell death. **Toxicologic pathology**, v. 35, n. 4, p. 495–516, 2007.
- FLEURY, C.; MIGNOTTE, B.; VAYSSIÈRE, J.-L. Mitochondrial reactive oxygen species in cell death signaling. **Biochimie**, v. 84, n. 2, p. 131–141, 2002.
- GEORGE, O.; KOOB, G. F. Control of craving by the prefrontal cortex. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 11, p. 4165–6, 2013.
- GLEI, M., T. S.; SCHLÖRMANN, W. Comet assay : an essential tool in toxicological research. **Archives of Toxicology**, 2016.
- GONÇALVES, J. C.; SILVEIRA, A. L.; DE SOUZA, H. D.; NERY, A. A.; PRADO, V. F.; PRADO, M. A.; ULRICH, H.; ARAÚJO, D. A. The monoterpene (-)-carvone: A novel agonist of TRPV1 channels. **Cytometry Part A**, v. 83 A, n. 2, p. 212–219, 2013.
- GUNASEKARANA, V.; VICTOR, G.; CHAND, P. A Comprehensive Review on Clinical Applications of Comet Assay. **Journal of Clinical and Diagnostic** v. 9, n. 3, p. 1–5, 2015.
- GYORI, B. M.; VENKATACHALAM, G.; THIAGARAJAN, P.S.; HSU, D.; CLEMENT, M. V. OpenComet: An automated tool for comet assay image analysis. **Redox Biology**, v. 2, n. 1, p. 457–465, 2014.
- HORVÁTHOVÁ, E.; SLAMENOVÁ, D.; MARSÁLKOVÁ, L.; SRAMKOVÁ, M.;

WSÓLOVÁ, L. Effects of borneol on the level of DNA damage induced in primary rat hepatocytes and testicular cells by hydrogen peroxide. **Food and Chemical Toxicology**, v. 47, n. 6, p. 1318–1323, 2009.

HU, S.; SHENG, W. S.; LOKENSGARD, J.R.; PETERSON, P. K. Morphine induces apoptosis of human microglia and neurons. **Neuropharmacology**, v. 42, n. 6, p. 829–836, 2002.

HUR, J.; PAK, S.C.; KOO, B. S.; JEON, S. Borneol alleviates oxidative stress via upregulation of Nrf2 and Bcl-2 in SH-SY5Y cells. **Pharmaceutical Biology**, v. 51, n. 1, p. 30–35, 2013.

KATEBI, S. N.; RAZAVI, Y.; ALAMDARY, S.; KHODAGHOLI, F.; HAGHPARAST, A. Morphine could increase apoptotic factors in the nucleus accumbens and prefrontal cortex of rat brain's reward circuitry. **Brain Research**, v. 1540, p. 1–8, 2013.

KONG, Q. X.; WU, Z.Y.; CHU, X.; LIANG, R.Q.; XIA, M.; LI, L. Study on the anti-cerebral ischemia effect of borneol and its mechanism. **African journal of traditional, complementary, and alternative medicines: AJTCAM / African Networks on Ethnomedicines**, v. 11, n. 1, p. 161–164, 2014.

KOSTEN, T. R.; GEORGE, T. P. The neurobiology of opioid dependence: implications for treatment. **Science & practice perspectives / a publication of the National Institute on Drug Abuse, National Institutes of Health**, v. 1, n. 1, p. 13–20, 2002.

KUMARAVEL, T. S.; VILHAR, B.; FAUX, S. P.; JHA, A. N. Comet Assay measurements: A perspective. **Cell Biology and Toxicology**, v. 25, n. 1, p. 53–64, 2009.

LI, J. H.; LIN, L. F. Genetic toxicology of abused drugs: a brief review. **Mutagenesis**, v. 13, n. 6, p. 557–65, 1998.

LIU, R.; ZHANG, L.; LAN, X.; LI, L.; ZHANG, T. T.; SUN, J. H.; DU, G. H. Protection by borneol on cortical neurons against oxygen-glucose deprivation/reperfusion: Involvement of anti-oxidation and anti-inflammation through nuclear transcription factor kappaB signaling pathway. **Neuroscience**, v. 176, p. 408–419, 2011.

MAO, J.; SUNG, B.; JI, R.R.; LIM, G. Neuronal apoptosis associated with morphine tolerance: evidence for an opioid-induced neurotoxic mechanism. **The Journal of**

**neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 22, n. 17, p. 7650–61, 2002.

MILLER, E. C.; ZHANG, L.; DUMMER, B. W.; CARIVEAU, D. R.; LOH, H.; LAW, P. Y.; LIAO, D. Differential modulation of drug-induced structural and functional plasticity of dendritic spines. **Molecular Pharmacology**, v. 82, n. 2, p. 333–343, 2012.

MORGAN, M. M.; CHRISTIE, M. J. Analysis of opioid efficacy, tolerance, addiction and dependence from cell culture to human. **British Journal of Pharmacology**, v. 164, n. 4, p. 1322–1334, 2011.

SILVA, C.; SANTOS, J.; TAKAHASHI, C. An evaluation of the genotoxic and cytotoxic effects of the anti-obesity drugs sibutramine and fenproporex. **Human & Experimental Toxicology**, v. 29, n. 3, p. 187–197, 2010.

SKLAIR-TAVRON, L.; SHI, W. X.; LANE, S. B.; HARRIS, H. W.; BUNNEY, B. S.; NESTLER, E. J. Chronic morphine induces visible changes in the morphology of mesolimbic dopamine neurons. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, n. 20, p. 11202–11207, 1996.

SKRABALOVA, J.; DRASTICHOVA, Z.; NOVOTNY, J. Morphine as a Potential Oxidative Stress-Causing Agent. **Mini-reviews in organic chemistry**, v. 10, n. 4, p. 367–372, 2013.

VOLKOW, N. D.; WANG, G. J.; TOMASI, D.; BALER, R. D. Unbalanced neuronal circuits in addiction. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 23, n. 4, p. 639–648, 2013.

WANG, L. S.; WANG, L.; WANG, L.; WANG, G.; LI, Z. H.; WANG, J. J. Effect of 1-butyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate on the wheat (*Triticum aestivum* L.) seedlings. **Environmental toxicology**, v. 24, n. 3, p. 296–303, 2009.

## 4 CONCLUSÕES

A investigação do (-) - Borneol revelou que a molécula possui propriedades ansiolíticas e antiadictivas observadas em modelos animais com camundongos *Swiss webster*. Mais especificamente, podemos concluir que: (i) O (-) - Borneol potencializou o tempo de sono induzido por tiopental sódico; (ii) Em todos os modelos de ansiedade utilizados neste trabalho (teste da caixa claro-escuro, teste do labirinto em cruz elevado e teste do campo aberto) o (-) - Borneol apresentou efeito ansiolítico; (iii) O (-) - Borneol interagiu molecularmente com o GABA<sub>A</sub>R em um sítio diferente do sítio dos BDZs; (iv) O (-) - Borneol interferiu no desenvolvimento de PCL por morfina e reduziu o comportamento de saltar, um dos sintomas de abstinência por morfina relacionados clinicamente com agitação e irritabilidade; (v) O (-) - Borneol foi capaz de reduzir a fragmentação de DNA induzida por morfina e apresentou atividade neuroprotetora sobre o efeito tóxico do opioide em áreas como hipocampo e CPF; (vi) O (-) - Borneol não apresentou efeito genotóxico em sangue periférico de camundongos.

Portanto, os dados apresentados nesse estudo encorajam tanto pesquisas com monoterpenos cujo foco seja a descoberta de novos fármacos para o tratamento de ansiedade/adicção, como maiores investigações no que tange os mecanismos moleculares envolvidos nos efeitos ansiolíticos e antiadictivos do (-) - Borneol. Porém, vale ressaltar que dentre o horizonte de potencialidades terapêuticas do (-) - Borneol (ex. antinociceptivo, aumento da permeabilidade da BHC etc.) o desenvolvimento dessa molécula como um fármaco seguro com capacidade em agregar vantagens terapêuticas ao uso de opioides, seja através da redução da adicção (diminuindo a ansiedade e portanto, a recaída e reinstalação do ciclo adictivo) ou através de seu efeito neuroprotetor é uma aplicação útil e inovadora para a molécula.



# ANEXOS