



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

VIVIANE BATISTA ESTRADA

**EFEITO DO ÁCIDO FÓLICO NA MODULAÇÃO DO
COMPORTAMENTO DE ANSIEDADE-SÍMILE EM RATOS**

Londrina
2019



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

VIVIANE BATISTA ESTRADA

**EFEITO DO ÁCIDO FÓLICO NA MODULAÇÃO DO
COMPORTAMENTO DE ANSIEDADE-SÍMILE EM RATOS**

Londrina

2019

VIVIANE BATISTA ESTRADA

**EFEITO DO ÁCIDO FÓLICO NA MODULAÇÃO DO
COMPORTAMENTO DE ANSIEDADE-SÍMILE EM RATOS**

Tese apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito para a obtenção do título de Doutor.

Orientador: Prof. Dr. Gislaine Garcia Pelosi Gomes

Londrina
2019

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

E82e Estrada, Viviane Batista .

Efeito do ácido fólico na modulação do comportamento de ansiedade-símile em ratos. / Viviane Batista Estrada. - Londrina, 2019.
55 f. : il.

Orientador: Gislaine Garcia Pelosi Gomes.

Tese (Doutorado em Ciências Fisiológicas) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, 2019.
Inclui bibliografia.

1. Ansiedade, ácido fólico e estresse de restrição. - Tese. I. Gomes, Gislaine Garcia Pelosi. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas. IV. Título.

CDU 574

VIVIANE BATISTA ESTRADA

**EFEITO DO ÁCIDO FÓLICO NA MODULAÇÃO DO
COMPORTAMENTO DE ANSIEDADE-SÍMILE EM RATOS**

Tese apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito para a obtenção do título de Doutor.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Gislaine Garcia Pelosi Gomes
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof Dr Ernane Torres Uchoa
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof Dr Célio Roberto Estanislau
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Profa. Dra. Karen Barros Parron Fernandes
Universidade do Norte do Paraná – UNOPAR

Profa. Dra. Lucinéia dos Santos
Universidade Estadual Paulista - UNESP

Londrina, 07 de agosto de 2019.

Aos meus pais *Marina (in memoriam)* e *Atílio*
pelo amor incondicional e por toda a dedicação.

Ao meu filho Otávio, luz da minha vida.

AGRADECIMENTO (S)

Primeiramente a Deus, o autor do meu destino.

Aos meus pais, Atílio e Marina (*in memoriam*) onde encontro amor incondicional, abrigo em todas as ocasiões e ensinamentos que fizeram de mim a pessoa que sou hoje.

Ao meu esposo, Diego por sua compreensão e companheirismo durante todo esse percurso, me apoiando nos momentos de dificuldades.

Ao meu filho Otávio, que deu um novo e maravilhoso sentido a minha vida.

Aos meus irmãos, cunhadas, minha sobrinha Milena e minhas tias queridas pelas conversas, orações e apoio.

A Prof. Dra. Gislaine Garcia Pelosi Gomes pela oportunidade, por seus ensinamentos, paciência, liderança e apoio. É um exemplo de resiliência, competência e compreensão, preocupado não só com a realização do trabalho, mas também com o ser humano como um todo. Posso dizer que a minha formação, inclusive pessoal, não teria sido a mesma sem seus conselhos.

A Prof. Dra. Lucinéia dos Santos, um exemplo de profissional que me inspirou e estimulou desde a graduação a aventurar-me pela pesquisa. Com toda certeza, não chegaria a tal desfecho sem seu incentivo e ensinamento. Serei grata por todo sempre.

Aos amigos do laboratório, por tornarem o convívio diário mais alegre, foi extremamente enriquecedor conhecer e conviver com cada um de vocês.

A Universidade Estadual de Londrina e ao Programa Multicêntrico de Ciências Fisiológicas por proporcionarem meu aprendizado.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Fundação Araucária, por conceder a minha bolsa de estudos e financiar o nosso projeto.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para este trabalho.

ESTRADA, Viviane Batista. **Efeito do ácido fólico na modulação do comportamento de ansiedade-símile em ratos**. 2019. 57 f. Tese (Doutorado Multicêntrico em Ciências Fisiológicas) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2019.

RESUMO

Os transtornos de ansiedade têm apresentado alta prevalência ao longo da vida e interfere acentuadamente no desempenho do indivíduo em diversas atividades, além de estarem associados a custos a saúde pública. O ácido fólico (AF) desempenha papel como cofator de vários processos biológicos e parece modular alguns distúrbios psiquiátricos. No entanto, não há estudos que avaliam o efeito da AF em modelos de ansiedade. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da administração de AF em ratos submetidos aos testes do Labirinto em Cruz Elevado (LCE) e Campo Aberto (CA), modelos etológicos de ansiedade, bem como sua modulação no comportamento semelhante à ansiedade induzida por estresse de restrição. Assim, ratos Wistar (65 dias de idade) receberam AF 2,5, 5, 10 ou 50 mg/Kg ou solução salina (NaCl a 0,9%) i.p durante três dias consecutivos, 48h, 24h e 5h antes do LCE e CA, com base nos resultados destes experimentos os animais tiveram o sangue coletado para dosagem de corticosterona. No segundo momento, AF foi administrado em dose única 1h antes dos testes comportamentais. Para o estresse agudo os ratos foram submetidos a uma sessão de estresse em um tubo de restrição por 2h, no estresse repetido foram submetidos a restrição de 2h/14 dias consecutivos, ambos os grupos foram avaliados no LCE e CA 24h após a última sessão de estresse, foram realizadas coletas sanguíneas para posterior dosagem de corticosterona plasmática. Por fim, animais submetidos ao estresse de restrição agudo receberam administração repetida de AF (2,5, 5, 10 e 50 mg/Kg, i.p.) antes dos testes comportamentais. Nossos achados observaram efeito ansiogênico do AF no CA apenas quando foi administrado repetidamente, este comportamento não foi acompanhado de alteração na concentração de corticosterona plasmática. A administração única ou repetida de AF diminuiu a atividade locomotora de forma dose-dependente no CA. O estresse de restrição agudo causou efeito ansiogênico-símile em ambos os modelos, no entanto esses resultados não foram alterados pela administração repetida de AF. O estresse repetido não alterou o comportamento observado no LCE e CA. Não foram observadas alterações nas dosagens de corticosterona 24h após o estresse agudo ou repetido. Nosso trabalho aponta para a modulação do AF no comportamento relacionado a ansiedade e atividade locomotora; entretanto, outros estudos são necessários para entender quais os mecanismos envolvidos.

Palavras-chave: Ansiedade. Ácido fólico. Labirinto em cruz elevado. Teste de campo aberto. Estresse agudo de restrição. Estresse repetido de restrição.

ESTRADA, Viviane Batista. **Effect of folic acid on the modulation of anxiety-like behavior in rats**. 2019. 57 f. Thesis (Multicentric Doctorate in Physiological Sciences) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2019.

ABSTRACT

Anxiety disorders have a high prevalence throughout life and strongly interfere with the performance of the individual in various activities, as well as being associated with costs to public health. Folic acid (FA), is a vitamin B complex that has a role as cofactor of several biological processes and demonstrates an apparent modulation in some psychiatric disorders. However, there is few study that evaluates the effect of FA in models of anxiety. The goal of this work was to evaluate the effect of FA in rats submitted to the elevated plus maze (EPM) and open field (OF), tests ethological models of anxiety, and its modulation in restraint stress-induced anxiety-like behavior. Thus, Wistar rats (65 days age) received AF 2.5, 5, 10 or 50 mg/kg or saline (0.9% NaCl) ip. for three consecutive days, 48h, 24h and 5h before EPM and OF test, based on the results of these experiments the animals had their blood collected for corticosterone dosing. At the second moment, FA was given in a single dose 1h before the behavioral tests. For acute stress the rats were submitted to a stress session in a restraint tube for 2h, in repeated stress they were subjected to restraint for 2h/14 consecutive days, both groups were evaluated in the LCE and CA 24h after the last stress session, blood samples for subsequent plasma corticosterone dosage were performed. Finally, animals subjected to acute restraint stress received repeated administration of FA (2.5, 5, 10 and 50 mg / kg, i.p.) before behavioral tests. Our findings observed an anxiogenic effect of FA on OF only repeated administration, this behavior was not accompanied by changes in plasma corticosterone concentration. Single or repeated administration of FA decreased dose-dependent locomotor activity in OF. Acute restraint stress caused an anxiogenic-like effect in both models; however, these results were not altered by repeated administration of FA. Repeated stress did not cause behavioral changes in the EPM and OF. No change in corticosterone concentration were observed 24h after acute or repeated stress. Our work points to FA modulation in anxiety-related behavior and locomotor activity; however, further studies are needed to understand the mechanisms involved.

Key words: Anxiety. Folic acid. Elevated plus maze. Open field. Acute restraint stress. Repeated restraint stress.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Classificação dos transtornos de ansiedade. DSM V	14
Figura 2. Labirinto em cruz elevado.....	17
Figura 3. Campo aberto..	18
Figura 4. Tubo de restrição.....	20
Figura 5. A relação entre o metabolismo do folato e o ciclo de metilação..	23
Figura 6 Efeito da administração de ácido fólico 45, 24 e 5h antes do LCE..	32
Figura 7. Efeito da administração de ácido fólico 45, 24 e 5h antes do CA..	32
Figura 8 Efeito do tratamento com AF 5mg/Kg nos níveis plasmáticos de corticosterona.. ...	33
Figura 9. Efeito da administração única de ácido fólico 5 e 50 mg/Kg 1h antes do LCE.	34
Figura 10. Efeito da administração única de ácido fólico 1h antes do CA.	34
Figura 11. Efeito do estresse agudo em ratos submetidos ao LCE.....	35
Figura 12. O Efeito do estresse agudo em ratos submetidos ao CA.....	36
Figura 13. Efeito do estresse repetido em ratos submetidos ao LCE.	37
Figura 14. O Efeito do estresse repetido em ratos submetidos ao CA..	37
Figura 15. Efeito tardio do estresse na concentração plasmáticas de corticosterona.	38
Figura 16. Efeito da administração de ácido fólico 45, 24 e 5h antes do LCE em ratos préviamente estressados.....	39
Figura 17. Efeito da administração de ácido fólico 45, 24 e 5h antes do CA em ratos préviamente estressados.	40

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACTH	Hormônio adrenocorticotrófico
AF	Ácido Fólico
CA	Campo aberto
CTR	Controle
CRH	Hormônio liberador de corticotrofina
DNA	Ácido Desoxirribonucleico (<i>Deoxyribonucleic Acid</i>)
DNMT	DNA metiltransferase
DSM	Manual de Diagnóstico e Estatística das Doenças Mentais
HPA	Hipotálamo-hipófise-adrenal
LCE	Labirinto em cruz elevado
SAM	S-adenosilmetionina
SCP	Substância cinzenta periaquedutal
TAG	Transtorno de ansiedade generalizada

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
1.1	Ansiidade	13
1.2	Reações de defesa e ansiedade	14
1.3	Modelos etológicos de ansiedade: LCE e CA	16
1.4	Ansiidade induzida pelo estresse	18
1.5	Ácido Fólico	20
2	OBJETIVOS	25
2.1	Objetivo geral	25
2.2	Objetivos Específicos	25
3	METODOLOGIA	26
3.1	Animais	26
3.2	Drogas	26
3.3	Estresse de restrição	26
3.4	Testes comportamentais	27
3.5	Coleta de sangue para dosagem de corticosterona plasmática	27
3.6	Dosagem de corticosterona plasmática	27
3.7	Protocolo experimental	28
3.7.1	Avaliação da administração repetida de AF no comportamento dos animais submetidos ao teste LCE e CA	28
3.7.2	Avaliação da concentração plasmática de corticosterona após administração repetidas de AF	28
3.7.3	Avaliação da administração única de ácido fólico no comportamento dos animais submetidos ao teste LCE e CA	29
3.7.4	Efeito comportamental tardio do estresse de restrição agudo em animais expostos ao LCE e ao CA	29
3.7.5	Efeito comportamental tardio do estresse de restrição repetido em animais expostos ao LCE e ao CA	29
3.7.7	Efeito do ácido fólico no comportamento de ansiedade-símile causado pelo estresse de restrição agudo	30
3.8	Análise dos dados	30
4	RESULTADOS	31

4.1	Efeito da administração repetida de AF no comportamento dos animais submetidos ao teste do LCE e no CA	31
4.2	Efeito da administração repetida de AF 5 mg/Kg na concentração plasmática de corticosterona.....	33
4.3	Efeito da administração de dose única de AF em ratos submetidos ao LCE e CA. 33	
4.4	Efeito comportamental tardio do estresse de restrição agudo em animais expostos ao LCE e ao CA	34
4.5	Efeito comportamental tardio do estresse de restrição repetido em animais expostos ao LCE e ao CA.....	36
4.6	Efeito tardio do estresse de restrição agudo e repetido na concentração plasmática de corticosterona.....	38
4.7	Efeito da administração repetida de AF em ratos submetidos previamente ao estresse agudo de restrição.	38
5	DISCUSSÃO	41
6	CONCLUSÃO	46
7	REFERÊNCIAS	47

1 INTRODUÇÃO

A medida que o mundo se industrializava o estilo de vida da sociedade se transformava acarretando em diversos problemas como ritmo de trabalho intenso, acesso desigual à saúde, condições de moradia precárias, distribuição desigual da renda, desemprego, altas taxas de violência e criminalidade (FERREIRA et al., 2018; KESSLER et al., 2011).

Frente a uma sociedade moderna que exige grande capacidade de adaptação física, mental e social, os indivíduos estão frequentemente expostos a situações de conflitos, angústias, estresse e desestabilizações emocionais. Assim, a ansiedade emerge como uma consequência direta aos persistentes esforços adaptativos do indivíduo à sua situação existencial (BANDELOW; MICHAELIS, 2015).

O total estimado de pessoas vivo com ansiedade no mundo é de 264 milhões, este total reflete um aumento de 14,9% de 2005 a 2015 (KESSLER et al., 2011; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017).

1.1 ANSIEDADE

Biologicamente, a ansiedade é uma resposta de alerta do organismo frente a situações ameaçadoras que leva a um conjunto de alterações emocionais, fisiológicas e cognitivas com o intuito de adaptar o indivíduo ao meio e/ou preservar a vida (BRAGA, 2010; CANTERAS; GRAEFF, 2014; MCNAUGHTON; CORR, 2004; VIANA, 2010).

O termo ansiedade provém do grego *anshein*, que significa estrangular, sufocar e oprimir, o que condiz com as reações de taquicardia, tensão muscular, antecipação apreensiva, pensamento catastrófico e medo vivenciados na ansiedade (PRATT, 1992).

Dessa forma, a ansiedade é um mecanismo importante pelo qual nos adaptamos e respondemos aos perigos, mas alterações nessa regulação podem resultar em ansiedade acentuada, persistente e excessiva ou em medo irracional (CANTERAS; GRAEFF, 2014; GRAEFF, 2002).

Embora o limite entre o que se denomina ansiedade normal e patológica é muitas vezes difícil de se estabelecer, assume-se que a ansiedade torna-se patológica quando é experimentada durante um longo período de tempo (mais de seis meses), de forma excessiva ou quando não corresponde à situação que a desencadeia (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2013; KESSLER et al., 2011).

Os transtornos de ansiedade compartilham características de medo e ansiedade excessivos, medo é a resposta emocional a ameaça iminente e real, enquanto ansiedade é a antecipação de ameaça futura; há sobreposição entre os dois estados (DSM V, 2014).

Segundo a classificação dos distúrbios mentais, apresentada na quinta edição do Manual de Diagnóstico e Estatística das Doenças Mentais (DSM V, 2014) e publicado pela Associação Psiquiátrica Norte-Americana, as manifestações da ansiedade patológica podem ser agrupadas em diferentes categorias, conforme o quadro abaixo:

Figura 1. Classificação dos transtornos de ansiedade.

Transtorno de Ansiedade de Separação
Mutismo seletivo
Fobia (Específica, social e agorafobia)
Transtorno de ansiedade generalizada
Transtorno do pânico
Transtorno de ansiedade induzido por substância/medicamento

Fonte: DSM V

As categorias dos transtornos de ansiedade diferem entre si nos tipos de objetos ou situações que induzem ao medo, ansiedade ou comportamento de esquiva. Assim, embora tenham uma comorbidade, podem ser diferenciados pelo tipo da situações temidas.

O transtorno de ansiedade generalizada (TAG) tem alta proporção na população geral e traz grande impacto na qualidade de vida dos indivíduos (BANDELOW et al., 2013; BANDELOW; MICHAELIS, 2015). O TAG caracteriza-se por preocupações excessivas, expectativa apreensiva e frequentes em relação a questões diárias ou circunstâncias da vida. O indivíduo portador desse transtorno apresenta dificuldade em controlar a preocupação, e o estado de apreensão constante geralmente é acompanhado por sintomas como inquietação, cansaço, dificuldade em concentrar-se, irritabilidade, tensão muscular e perturbação do sono (DSM V, 2014).

1.2 REAÇÕES DE DEFESA E ANSIEDADE

Assim como os seres humanos, os animais mais complexos foram selecionados segundo o mesmo padrão de resposta defensiva o que aumentam as chances de sobrevivência da espécie,

desta forma, essas respostas podem ser estudadas em diferentes espécies, pois, são similares (BLANCHARD; BLANCHARD, 1988; MCNAUGHTON; GRAY, 2000; PRATT, 1992).

Como estratégia defensiva, os animais tendem a apresentar comportamento de avaliação de risco, imobilização, fuga ou ataque defensivo considerando o nível de ameaça ao qual são submetidos: potencial ou incerta, distal e proximal (BLANCHARD et al., 2001).

Estímulos que sinalizam uma ameaça potencial, como em ambientes desconhecidos onde a presença do predador é incerta, evocam comportamentos de avaliação de risco (*risk assessment*) em direção à fonte do perigo. Estes comportamentos refletem o conflito entre a aproximação e a esquiva, e são caracterizados por repetidas tentativas de aproximação, seguidas de esquiva ao estímulo aversivo.

Estímulos distais são caracterizados pela presença real do perigo, induzem tanto a resposta de esquiva como a de imobilidade. Nesta condição, caso exista uma rota de fuga ao encontro com o predador, o animal tenta preferencialmente escapar, no entanto, caso a fuga não seja viável o animal tende a permanecer imóvel no chamado congelamento (*freezing*).

Por fim, o terceiro nível (proximal) ocorre quando o predador está muito próximo, ou já em contato com a presa. Nessa situação, o recurso defensivo adotado pela presa é a fuga ou resposta de agressão defensiva (posturas de ameaça e mordidas ao predador) (BLANCHARD; BLANCHARD, 1988).

É proposto que reações de defesa específicas correspondam a distúrbios de ansiedade estabelecidos clinicamente. Por exemplo, a avaliação de risco e a fuga estão relacionados, respectivamente, a ansiedade generalizada e o pânico (BRANDÃO et al., 2003; GRAEFF, 1994).

Evidências experimentais relacionam cada estratégia de defesa com estruturas encefálicas correspondente, com o objetivo de identificar as bases neurais envolvidas com a ansiedade (PRATT, 1992).

Neste sentido, têm sido proposto a existência de dois sistemas neurais responsáveis pelas reações de defesa dos animais: o sistema de inibição comportamental e o sistema cerebral de defesa (GRAEFF; HETEM, 2012; MCNAUGHTON; CORR, 2004).

O sistema de inibição comportamental tem como principal substrato neural o sistema septohipocampal, estruturas que facilitam o comportamento defensivo de esquiva frente a um perigo potencial e incerto, sendo postulada sua participação na mediação do distúrbio de ansiedade generalizada (MCNAUGHTON; GRAY, 2000).

Mediante uma situação de conflito entre aproximação e esquiva do perigo, o sistema septo-hipocampal tem a função de comparar os objetos conflitantes, o que levaria à inibição do comportamento (BRANDÃO et al., 2003).

As principais evidências do envolvimento destas estruturas na modulação de comportamentos defensivos foram baseadas em estudos mostrando que lesões destas áreas cerebrais induziam um efeito antiaversivo semelhante ao observado com a administração de drogas ansiolíticas clássicas como o diazepam e os barbitúricos (MCNAUGHTON; GRAY, 2000).

O sistema cerebral de defesa é representado por um conjunto de estruturas nervosas longitudinalmente organizadas, formado pela amígdala, hipotálamo medial e substância cinzenta periaquedutal que processam mecanismos associados às estratégias de defesa de luta ou fuga em resposta ao perigo proximal (GRAEFF, 1994).

Em humanos, a estimulação elétrica da substância cinzenta periaquedutal dorsal é relatada como uma situação extremamente desagradável caracterizada por fortes sentimentos de medo, morte iminente ou dor inespecífica e várias alterações autonômicas similares às aquelas ocorridas durante um ataque de pânico (NASHOLD; WILSON; SLAUGHTER, 1969). Em ratos, esta estimulação está envolvida no desenvolvimento de comportamento defensivo, como fuga e luta (VIANNA et al., 2001).

O hipotálamo, através de suas conexões com a hipófise mobiliza as alterações endócrinas que acompanham as reações de defesa, o hormônio adrenocorticotrópico (ACTH) secretado pela adeno-hipófise estimula o córtex da adrenal a liberar cortisol, cujas ações nos tecidos-alvos são catabólicas e ajudarão a promover a mobilização de fontes de energia do corpo para o enfrentamento da situação ameaçadora (GRAEFF; HETEM, 2012).

Quanto a amígdala parece exercer e influência modulatória sobre o comportamento de defesa integrado na substância cinzenta periaquedutal dorsal e teria um papel de interface entre as sensações e as emoções, selecionando e organizando as reações de defesa mais apropriadas à situação (GRAEFF, 1994).

1.3 MODELOS ETOLÓGICOS DE ANSIEDADE: LCE E CA

Com base nas estratégias de defesa dos animais, muitos modelos etológicos foram desenvolvidos com o objetivo de simular determinadas situações de perigo para investigar experimentalmente a neuropsicofarmacologia e eventuais formas de tratamento dos transtornos de ansiedade (PELLOW; FILE, 1986a; VIANA; TOMAZ; GRAEFF, 1994).

Sabe-se que animais expostos a novos ambientes ou estímulos podem gerar comportamentos defensivos ou de medo semelhantes aos observados em humanos, como a ansiedade (BLANCHARD; BLANCHARD, 1988). Diante disso, o Labirinto em Cruz Elevado (LCE) e Campo Aberto (CA) são modelos amplamente utilizados validados por critérios fisiológicos, farmacológicos e comportamentais (PELLOW et al., 1985; PRUT; BELZUNG, 2003). Por esses motivos foram os testes de escolha em nosso trabalho.

O LCE é composto por quatro passarelas dispostas perpendicularmente formando uma cruz simétrica unidas por uma plataforma central; duas passarelas apresentam paredes e recebem o nome de braço fechado, enquanto outras duas passarelas são desprovidas de paredes e recebem o nome de braço aberto (Figura 2).

Figura 2. Labirinto em cruz elevado.

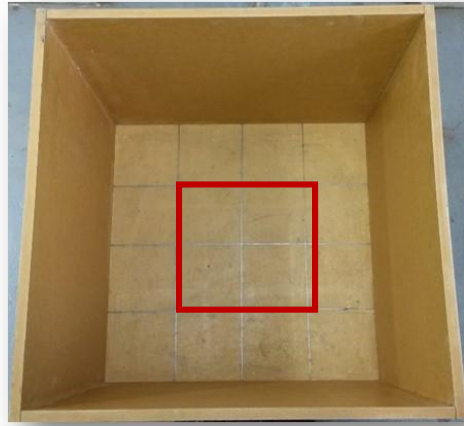


Fonte: (PIRES; TUFIK; ANDERSEN, 2012).

O fundamento do teste está no conflito entre a característica exploratória dos roedores versus a aversão de espaços abertos e elevados. Com isso, ainda que os animais sintam-se impelidos a explorar os braços abertos do LCE à procura de alimento, água, parceiros sexuais, eles tendem a evitá-los por serem locais potencialmente perigosos. Esse conflito entre aproximação-esquiva é considerado análogo à ansiedade humana (GRAEFF, 1994; PELLOW et al., 1985). Além disso, ansiolíticos como diazepam aumentam as entradas e tempo de permanência dos animais nos braços abertos em relação aos braços fechados, ao passo que agentes ansiogênicos como a picrotoxina diminuem esta proporção (PELLOW; FILE, 1986b).

O CA foi desenvolvido por Hall (1934) e constitui uma arena de formato variável circular, quadrado ou retangular, com linhas dispostas no chão (Figura 3).

Figura 5. Campo aberto.



A área em vermelho corresponde a região central.

Fonte: O próprio autor.

O procedimento, assim como o LCE, consiste em confrontar o animal com a novidade do ambiente. A ansiedade é mensurada através do tempo que o roedor permanece na região central do aparato, enquanto que, o número total de linhas cruzadas indica a atividade locomotora (CHOLERIS et al., 2001; LISTER, 1990; PRUT; BELZUNG, 2003).

Os roedores preferem a periferia ao centro do aparelho, possivelmente devido o fator tato sensorial por meios das informações geradas pelas vibrissas em contato com as paredes. Acredita-se que pertença a uma categoria de reações ao medo filogeneticamente determinadas (LISTER, 1990; PRUT; BELZUNG, 2003). Em experimentos com roedores, estes comportamentos são essenciais para compreender o efeito de diferentes drogas psicoestimulantes, ansiogênicas e ansiolíticas (CRUZ; LANDEIRA-FERNANDEZ, 2012; DE LACERDA, 2006; PRUT; BELZUNG, 2003; TREIT, 1985).

1.4 ANSIEDADE INDUZIDA PELO ESTRESSE

Entre os fatores etiológicos relacionados à ansiedade, o estresse tem recebido considerável atenção. Dados da literatura sugerem que exposição a experiências estressantes contribuem decisivamente para o desenvolvimento e patogênese deste transtorno (LAPMANEE et al., 2012).

O cientista e médico austríaco Hans Selye apresentou em 1936 o conceito de estresse sendo um conjunto de reações sistêmicas não específicas que ocorrem quando há exposição do organismo a agentes agressores, os quais denominou estressores. De modo geral, o estresse ocorre quando condições adversas provocam uma resposta fisiológica na tentativa de manter a homeostasia do organismo em se adaptar a um novo cenário (REIS et al., 2011).

Em resposta à condição de estresse, Selye denominou como “Síndrome Geral de Adaptação” os eventos de resposta ao estresse que ocorrem em três importantes fases: 1) a reação de alarme, na qual o organismo percebe o estímulo estressante; 2) a fase de resistência, que consiste na tentativa de adaptação do organismo frente ao estímulo, 3) a fase de exaustão, quando o organismo perde a capacidade de adaptação (MCEWEN, 2007).

A ativação do sistema simpato-adrenomedular e o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) são bem estabelecidos como mecanismos adaptativos do estresse (KREIBIG, 2010; MARIN; CRUZ; PLANETA, 2007).

Em relação ao sistema simpato-adrenomedular, o aumento da atividade do sistema nervoso autônomo simpático resulta na secreção de acetilcolina na medula suprarrenal a qual libera adrenalina e noradrenalina na corrente sanguínea. Uma vez liberadas, as catecolaminas induzem aumento da frequência cardíaca, do fluxo sanguíneo para os músculos, da glicemia e do metabolismo celular na tentativa de favorecer um melhor desempenho físico e mental durante o estresse (KREIBIG, 2010).

No tocante ao eixo HPA, sua ativação inicia-se através dos impulsos nervosos da amígdala que são transmitidos para o hipotálamo. O hipotálamo, por sua vez, secreta o hormônio liberador de corticotrofina (CRH), o qual passa pelo sistema porta hipotálamo-hipofisário chegando até a hipófise anterior, neste local, o CRH induz a secreção do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) que flui pela corrente sanguínea até o córtex da adrenal, induzindo a secreção de cortisol em humanos e corticosterona em roedores (CARRASCO; VAN DE KAR, 2003; REIS et al., 2011).

Em roedores, o estresse contribui para o progresso da ansiedade, levando a respostas fisiológicas e comportamentais exageradas (ANDRADE; GUIMARÃES, 2003; REIS et al., 2011). Neste sentido, o estresse de restrição é um modelo de estresse emocional inescapável o qual restringe o movimento do animal em um tubo cilíndrico ou semi cilíndrico (Figura 4).

Figura 6. Tubo de restrição.



Fonte: O próprio autor

Roedores expostos previamente ao estresse, apresentam diminuição do tempo e frequência de entrada nos braços abertos do LCE, assim como diminuição no tempo despendido na região central do CA em relação aos animais não estressados, comportamentos relacionados a ansiedade-símile (KIM; LEEM, 2014; PADOVAN; GUIMARÃES, 2000; REIS et al., 2011).

Conforme sua intensidade e tempo, o estresse pode ser considerado agudo ou crônico. O estresse agudo pode ser entendido como uma ameaça imediata, a curto prazo e o crônico, persiste por vários dias, semanas ou meses (LINO-DE-OLIVEIRA et al., 2001; PADOVAN; GUIMARÃES, 2000).

Pesquisas sugerem diferenças importantes nos neurocircuitos que medeiam as respostas à exposição aguda e crônica ao estresse. O núcleo paraventricular do hipotálamo e o núcleo dorsal da rafe estão envolvidos com estresse agudo, enquanto, substância cinzenta periaquedutal ventrolateral e o núcleo leito da estria terminal com o estresse crônico. A amígdala central e medial seria a interface entre os dois tipos de estresse (DE ANDRADE et al., 2018).

Além disso, o córtex pré-frontal, hipocampo e hipotálamo são regiões-chave envolvidas na modulação dos efeitos do estresse, assim como, no comportamento de ansiedade (CAMPOS et al., 2013; COLLINS et al., 2009; KEAY; BANDLER, 2006; MCNAUGHTON; CORR, 2004).

No entanto, os mecanismos pelos quais os efeitos do estresse se relacionam ao desenvolvimento de um transtorno de ansiedade não estão totalmente esclarecidos.

1.5 ÁCIDO FÓLICO

O ácido fólico (AF), vitamina solúvel do complexo B, foi chamada inicialmente de fator de Wills, em homenagem a médica inglesa que descreveu sua função no tratamento de anemia macrocítica em gestantes trabalhadoras da indústria têxtil. Em 1941 seu composto foi isolado das folhas do espinafre do qual deriva seu nome do latim “*folium*”, que significa folha (BRITO et al., 2012; MCNULTY et al., 2012).

O termo folato é usado para designar compostos na forma química de poliglutamato, é encontrado em vegetais folhosos verdes e em outros alimentos como a beterraba, abacate, banana, amendoins, feijões, fígado, rins, ovos e alguns peixes (MCNULTY; PENTIEVA, 2010; WINKELS et al., 2007).

Por sua vez, o AF (monoglutamato) é a forma sintética mais oxidada e com maior estabilidade usada na fortificação de alimentos e medicamentos (MCNULTY et al., 2012; SCAGLIONE; PANZAVOLTA, 2014). Embora, na literatura científica comumente o AF é usado para designar todas as formas desta vitamina (WINKELS et al., 2007).

Fortes evidências epidemiológicas e experimentais ligam a diminuição da concentração de AF a doenças neurodegenerativas e neuropsiquiátricas como Alzheimer, depressão, acidente vascular cerebral e doença de Parkinson e o mais conhecido distúrbio relacionada a sua baixa ingestão, defeitos do tubo neural (ALMEIDA et al., 2012; BRITO NORONHA et al., 2015; MATTSON; SHEA, 2003; REYNOLDS, 2002).

Desta forma, a concentração adequada de AF é fundamental para a prevenção de doenças crônicas não-transmissíveis, complicações gestacionais como descolamento da placenta, pré-eclâmpsia, partos prematuros, aborto espontâneos (BAILEY et al., 2015; MOLLOY et al., 2008) e especialmente problemas congênitos em decorrência de defeitos do fechamento do tubo neural (BAILEY et al., 2015; SANTOS et al., 2016).

Com o objetivo de aumentar a ingestão diária de AF pela população, principalmente pelas mulheres em idade reprodutiva, diversos países, inclusive o Brasil, adotaram a fortificação da farinhas de trigo e milho com AF, com o intuito de reduzir a deficiência de folato e diminuir a incidência de defeitos no tubo neural (MORRIS et al., 2007; SMITH; KIM; REFSUM, 2008).

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), por meio da Resolução nº 150, determinou a obrigatoriedade da fortificação de farinhas de milho e trigo com AF. Segundo a legislação, cada 100 gramas deverão conter 140 µg a 220 µg de AF (BRASIL, 2017).

Há uma correlação entre o aumento dos níveis séricos de folato e melhora em algumas desordens psiquiátricas (KRONENBERG; COLLA; ENDRES, 2009). Foi observado efeito protetor do AF contra o déficit cognitivo em idosos (FRANÇA, 2016). Além disso, há evidências de que o AF pode contribuir no tratamento de depressão, patologia que tem alta

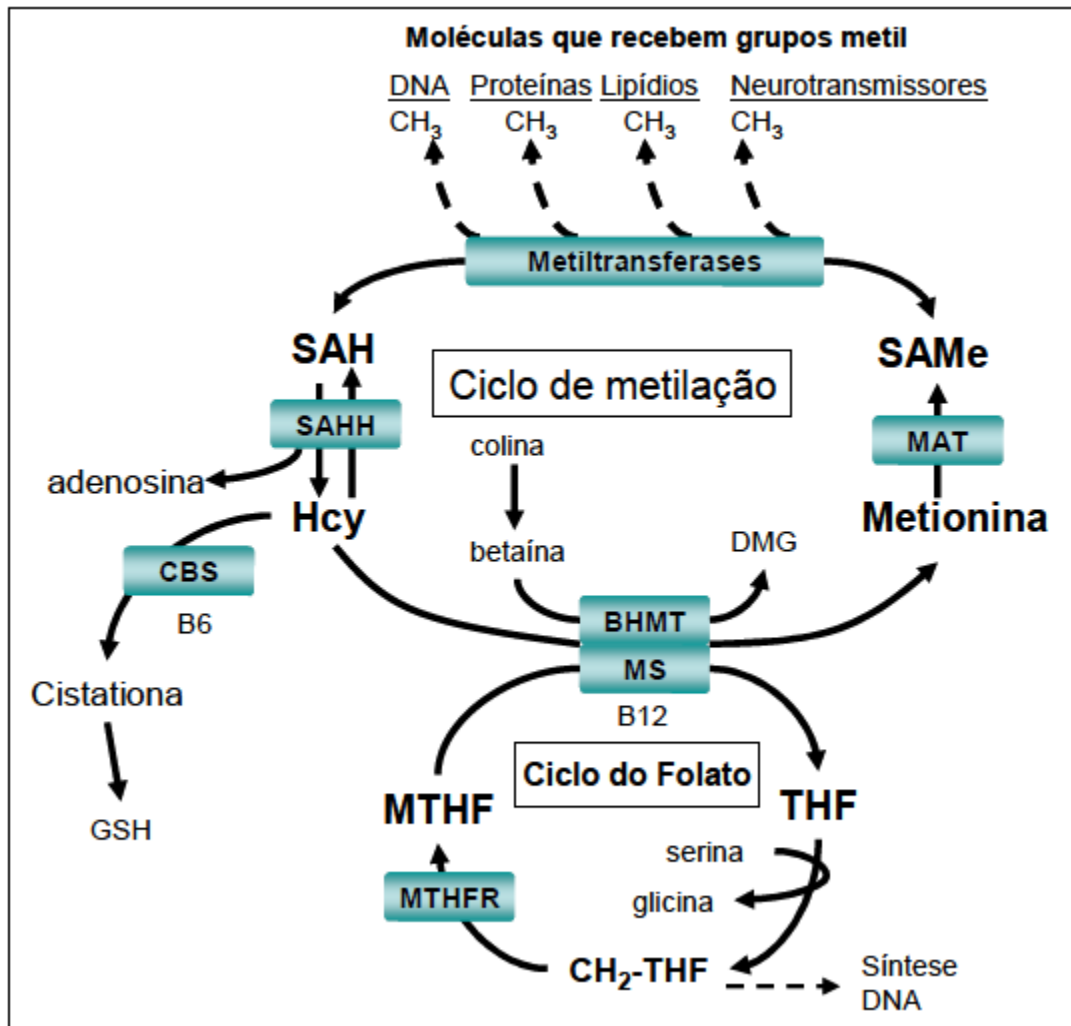
comorbidade com ansiedade (BROCARD et al., 2008b; KESSLER; GRUBER, 2008). No entanto, os efeitos do AF frente a patologia de ansiedade ainda não foram elucidados.

Para ser biologicamente ativo, o AF necessita sofrer redução pelas formas intermediárias de dihidrofolato e tetrahidrofolato pela adição de átomos de hidrogênio nas posições 7,8 e 5,6,7,8, respectivamente, e metilado a 5-metil-tetrahidrofolato (5-metil THF), a forma ativa da vitamina encontrada no plasma ligado principalmente à albumina (DJUKIC, 2007; KRONENBERG; COLLA; ENDRES, 2009). O folato circulante é então transportado para dentro das células através de duas famílias de transportadores: o carreador de folato reduzido (RFC) e os receptores de folato (RF) (DJUKIC, 2007).

Dentro da célula, o 5-metil-THF é desmetilado, doa o radical metila para converter a homocisteína em metionina, etapa catalisada pela ação da enzima metionina sintase (MS), gerando metionina e tetrahidrofolato. A metionina é então convertida pela enzima metionina adenosil transferase, a S-adenosilmetionina (SAM), que transfere o grupo metil ao carbono 5 das citosinas, geralmente seguidas por guaninas (dinucleotídeos CpGs), por meio de DNA-metiltransferases (DNMTs) (Figura 5); (BROCARD et al., 2008b; REYNOLDS, 2006; SMITH; KIM; REFSUM, 2008). Assim, o AF também pode alterar a metilação de DNA, um importante mecanismo epigenético (ECKART et al., 2013).

Ainda, o AF está envolvido na regulação epigenética da proliferação de células-tronco neurais que são necessárias para o desenvolvimento e reparo no sistema nervoso, através de DNMTs (YU et al., 2014).

Figura 7. A relação entre o metabolismo do folato e o ciclo de metilação.



O tetrahydrofolato (THF) é convertido em 5,10-metileno-tetrahydrofolato (5,10-MTHF) e em seguida reduzido a 5-metil-tetrahydrofolato (5-MeTHF) pela ação da enzima metileno tetrahydrofolato redutase (MTHFR), dirigindo assim um grupo metil para a formação da metionina, etapa catalisada pela ação da enzima metionina sintase (MS). A conversão de homocisteína (Hcy) em metionina serve como uma importante fonte de metionina para a síntese de s-adenosilmetionina (SAME), um importante agente de metilação in vivo. CBS= cistationina β-sintetase; SAH= S-adenosil homocisteína.

Fonte: BROCARDO, 2008; adaptado de BOTTIGLIERI, 2005.

Estudos demonstram uma diminuição significativa na metilação do DNA em mulheres submetidas a uma dieta com baixa quantidade de ácido fólico durante 7 dias, assim como, em fígado de ratos submetidos a deficiência de AF durante dieta de 4 semanas (BALAGHI; WAGNER, 1993).

Há indícios de que o AF desempenhe um papel na modulação de respostas comportamentais através de sua modulação em diferentes regiões do sistema nervoso central

(BROCARDO et al., 2008a). A existência de transportadores de folato no sistema nervoso central demonstra sua importância no metabolismo cerebral (DJUKIC, 2007).

Além disso, o AF preveniu danos neurais no hipocampo e córtex, e alterações de corticosterona induzidos pelo estresse (GAO et al., 2017). Assim, é possível que o AF exerça um papel na modulação da ansiedade, assim como de outros efeitos desencadeados pelo estresse.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito do AF na modulação do comportamento de ansiedade em ratos

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Avaliar o efeito da administração repetida de AF nas respostas comportamentais causadas pela exposição ao LCE e ao CA;
- ✓ Avaliar a concentração plasmática de corticosterona nos animais que receberam administração repetida de AF;
- ✓ Investigar o efeito da administração aguda de AF nas respostas comportamentais causadas pela exposição ao LCE e CA;
- ✓ Avaliar a resposta tardia ao estresse de restrição agudo e repetido no comportamento dos animais expostos ao LCE e CA
- ✓ Verificar a resposta tardia ao estresse de restrição agudo e repetido na concentração plasmática de corticosterona;
- ✓ Verificar o efeito da administração repetida de AF na resposta comportamental tardia ao estresse de restrição agudo de animais expostos ao LCE e CA.

3 METODOLOGIA

O projeto foi desenvolvido no Laboratório de Neurociência e Farmacologia Cardiovascular, pertencente ao Departamento de Ciências Fisiológicas da Universidade Estadual de Londrina.

3.1 ANIMAIS

Foram utilizados ratos Wistar (65 dias de idade) provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual de Londrina (UEL). Os animais foram transferidos para o Biotério do Departamento de Ciências Fisiológicas e mantidos sob condições padronizadas (temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, período de 12h claro/escuro) com água e ração à vontade. O protocolo experimental foi aprovado pelo comitê de ética local (CEUA protocolo nº19030.2015.69).

3.2 DROGAS

Ácido Fólico (Sigma-Aldrich; BR) foi dissolvido em salina (NaCl 0,9%) e administrado nas doses de 2,5, 5, 10 ou 50 mg/Kg i.p (MATTÉ et al., 2006). Anestésico: Uretana (Sigma, St. Louis, Missouri, EUA).

3.3 ESTRESSE DE RESTRIÇÃO

Os ratos foram introduzidos em um tubo de restrição semicilíndrico (25 x 7 x 5 cm), para o estresse agudo cada animal foi submetido a apenas uma sessão de restrição por 2h, no estresse repetido foram submetidos a restrição de 2h por 14 dias consecutivos, em seguida, transferidos aos pares para as gaiolas (20 x 30 x 32 cm) e mantidos no biotério. Os testes comportamentais e a coleta de materiais biológicos ocorreram 24h. após o estresse (KIM; LEEM, 2014; PADOVAN; GUIMARÃES, 2000). O grupo controle foi composto de animais não manuseados.

3.4 TESTES COMPORTAMENTAIS

Os testes comportamentais foram realizados 24h após o estresse agudo ou 24h após a última sessão de estresse repetido (PADOVAN; GUIMARÃES, 2000). O LCE é constituído por quatro braços de madeira de mesmas dimensões (50 cm de comprimento por 10 cm de largura), elevados 50 cm em relação ao solo. Dois dos braços são circundados por paredes laterais (40 cm de altura) e estão dispostos perpendicularmente à dois outros braços que permanecem desprovidos de paredes (braços abertos). Para evitar a queda dos animais, os braços abertos são delimitados por uma proteção de acrílico de 1 cm de altura. No dia do experimento, cada rato foi colocado no centro do labirinto com a sua cabeça virada para um dos braços fechados e o comportamento dos animais foi gravado por 5 min. Foram analisados o tempo gasto nos braços abertos e o número de entradas (critério 4-patas) nos braços abertos e braços fechados (PELLOW et al., 1985).

Imediatamente após o LCE, o animal foi submetido ao teste do CA 60 x 60 cm rodeado por paredes de 30 cm de altura; marcado com nove quadrados de 20 x 20 cm (HAZIM et al., 2014; MACHADO et al., 2016). Cada rato foi colocado individualmente no centro do aparato e a atividade exploratória foi calculada por 5 min. O tempo gasto na região central foi utilizado como medida de ansiedade e o número total de linhas cruzadas com todas as quatro patas como atividade locomotora (KATZ; ROTH; CARROLL, 1981; SESTAKOVA et al., 2013). A temperatura ambiente foi mantida a $22 \pm 1^\circ\text{C}$ por um condicionador de ar, os testes foram realizados entre 12:00h e 14:00h.

3.5 COLETA DE SANGUE PARA DOSAGEM DE CORTICOSTERONA PLASMÁTICA

Os animais foram decapitados por guilhotina para coleta do sangue e posterior dosagem de corticosterona plasmática.

Para a dosagem de corticosterona para o grupo experimental tratado com AF e que demonstrou alteração comportamental, os animais foram divididos em grupo controle (NaCl 0,9%) e grupo tratado com AF na dose de 5 mg i.p 48, 24 e 5h antes da coleta.

Nos animais submetidos ao estresse agudo ou repetido a coleta de sangue para a dosagem de corticosterona foi realizada 24h. após a última sessão de estresse.

3.6 DOSAGEM DE CORTICOSTERONA PLASMÁTICA

A determinação da concentração de corticosterona plasmática foi feita pelo método fluorimétrico de GUILLEMIN et al. (1959) o qual baseia-se na fluorescência da corticosterona em ácido sulfúrico. Para a execução do método, tem-se como solução padrão 1 mg de

corticosterona dissolvida em 10 mL de etanol absoluto. Em relação às amostras dos animais, 200 µL de plasma foram acrescidos em 6 mL de diclorometano, com posterior agitação e aspiração da fase superior, possibilitando a partição e extração da corticosterona. Após isso, 500 µL de NaOH 0,1 N foram adicionados à amostra para lavagem, seguido por agitação e aspiração da fase superior; após, 500 µL de água destilada foram adicionados, fez-se agitação. Como branco, apenas 4mL de diclorometano foram utilizados. Na segunda etapa do método, 5, 10 e 20 µL de solução “working” (0,5 mL de solução padrão e etanol) foram adicionados ao tubo da solução padrão e 1 mL de (H₂SO₄: Etanol) foi acrescido a todos os tubos para uma segunda extração, seguido por agitação e repouso de 20 minutos. A leitura foi feita em fluorímetro, com excitação 477 nm, emissão 520 nm e sensibilidade 11. Os valores da concentração plasmática de corticosterona obtidos foram expressos em µg.dL⁻¹.

3.7 PROTOCOLO EXPERIMENTAL

3.7.1 Avaliação da administração repetida de AF no comportamento dos animais submetidos ao teste LCE e CA

Esse protocolo teve como objetivo avaliar se a administração sistêmica repetida de AF influenciaria nos comportamentos observados nos animais durante a exposição ao LCE e ao CA. Dessa forma, os animais foram divididos em grupo controle (NaCl 0,9%) e grupo tratado com AF nas doses de 2,5, 5, 10 ou 50 mg de AF i.p (MATTÉ et al., 2006) para construção da curva dose-resposta. Cada animal recebeu a mesma dose de AF durante três dias consecutivos, 48h, 24h e 5h antes dos testes comportamentais.

3.7.2 Avaliação da concentração plasmática de corticosterona após administração repetidas de AF

Esse protocolo teve como objetivo avaliar se a administração de AF interferiria com os níveis plasmáticos de corticosterona, a dose foi escolhida com base nos resultados dos experimentos comportamentais prévios. Dessa forma, os animais foram divididos em grupo controle (NaCl 0,9%) e grupo tratado com AF na dose de 5 mg de AF i.p 48, 24 e 5h antes da coleta.

3.7.3 Avaliação da administração única de ácido fólico no comportamento dos animais submetidos ao teste LCE e CA.

Esse protocolo teve como objetivo avaliar se a administração única sistêmica de AF influenciaria nos comportamentos observados nos animais durante a exposição ao LCE e ao CA. Dessa forma, os animais foram divididos em grupo controle (NaCl 0,9%) e grupo tratado com AF nas doses de 5 mg ou 50 mg de AF i.p (MATTÉ et al., 2006) 1h antes dos testes comportamentais de ansiedade (BROCARDO et al., 2008b).

3.7.4 Efeito comportamental tardio do estresse de restrição agudo em animais expostos ao LCE e ao CA

O protocolo teve como objetivo avaliar se o estresse de restrição agudo modificaria o comportamento dos animais expostos ao LCE e CA 24h. após o término do estresse. Assim, os animais foram divididos em grupo estresse agudo, animais que foram submetidos a apenas uma sessão de estresse por 2h. e avaliados no LCE e CA 24h. após; e grupo não estressado, animais que não passaram pelo protocolo de estresse de restrição agudo.

3.7.5 Efeito comportamental tardio do estresse de restrição repetido em animais expostos ao LCE e ao CA

O protocolo teve como objetivo avaliar se o estresse de restrição repetido modificaria o comportamento dos animais expostos ao LCE e CA 24h. após o término do estresse. Assim, os animais foram divididos em grupo estresse repetido, animais que foram submetidos a sessão de estresse por 2h/dia durante 14 dias consecutivos e avaliados no LCE e CA 24h. após a última sessão de estresse; e grupo não estressado, animais que não passaram pelo protocolo de estresse de restrição repetido.

3.8.6 Efeito tardio do estresse de restrição agudo e repetido na concentração plasmática de corticosterona.

O protocolo teve como objetivo avaliar se o estresse de restrição agudo ou repetido modificaria a concentração plasmática de corticosterona 24h. após o término do estresse. Assim, os animais foram divididos em grupo estresse de restrição agudo (animais que passaram por uma única sessão de estresse de 2h), estresse de restrição repetido (animais que foram submetidos a sessão de estresse por 2h/dia durante 14 dias consecutivos) e não estressado (animais que não passaram pelo protocolo de estresse) e, 24h. após a última sessão de estresse,

os animais foram decapitados por guilhotina para coleta do sangue e posterior dosagem de corticosterona plasmática.

3.8.7 Efeito do ácido fólico no comportamento de ansiedade-símile causado pelo estresse de restrição agudo.

O objetivo foi verificar se a administração sistêmica repetida de AF modificaria a resposta ansiogênica-símile causada pela exposição prévia ao estresse de restrição agudo. Dessa forma, os animais receberam AF (2,5, 5, 10 e 50 mg/Kg, i.p.) durante três dias consecutivos (48h, 24h, 5h antes dos testes comportamentais) ou salina (NaCl 0,9%). Todos os animais passaram pelo estresse de restrição agudo 24h. antes do teste comportamental.

3.8 ANÁLISE DOS DADOS

Para o teste no LCE, a porcentagem de entradas de braços abertos ($100 \times \text{abertas}/\text{totais}$) e de tempo gasto nos braços abertos ($100 \times \text{aberto}/(\text{aberto}+\text{fechado})$), bem como o número de entradas de braços fechados no LCE foram calculados.

O software GraphPrim 6.0 foi utilizado para análise estatística dos dados. Os resultados do LCE e CA foram submetidos a uma análise descritiva na qual foi avaliada a normalidade e homogeneidade de variância dos dados. Os dados foram analisados através de testes estatísticos não paramétricos Kruskal-Wallis (KW) seguido pelo pós teste de Dunn's ou Mann. Todos os dados são expressos como Mediana (mínimo-máximo), foi adotado o nível de significância de 5%.

4 RESULTADOS

4.1 EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO REPETIDA DE AF NO COMPORTAMENTO DOS ANIMAIS SUBMETIDOS AO TESTE DO LCE E NO CA

A administração de AF nas doses de 2,5, 5, 10 ou 50 mg/Kg i.p. 48, 24 e 5h antes do teste do LCE não causou mudanças significativas na porcentagem de entrada [CTR: 25 (0 – 46,7); AF 2,5: 25 (0 – 45); AF 5: 28,5 (14,3 – 54,55); AF 10: 25 (16,6 – 50); AF 50: 11,1 (0 – 27,2); KW= 9,4; p= 0,05; Figura 6 A] e na frequência de entrada nos braços fechados [CTR: 7 (3 – 9); AF 2,5: 6 (1 – 11); AF 5: 5 (4 – 8); AF 10: 9 (6 – 14); AF 50: 8 (1 – 9); KW= 6,4; p= 0,16; Figura 6 B], no entanto, a dose de 50 mg/Kg causou uma diminuição no tempo gasto nos braços abertos quando comparado ao grupo controle [CTR: 10,1 (0 – 29,4); AF 2,5: 4,9 (0 – 31); AF 5: 8,1 (2,6 – 20,3); AF 10: 13,7 (4,1 – 43); AF 50: 0,5 (0 – 10,1); KW= 10,1; p= 0,03; Figura 6 C].

No CA, a administração de AF 5 mg/Kg causou uma diminuição no tempo gasto na região central em relação ao controle [CTR: 24 (3 – 30); AF 2,5: 11 (3,8 – 18,6); AF 5: 7,2 (1,3 – 10,1); AF 10: 9,5 (3,7 – 15,5); AF 50: 17 (7,5 – 46,4); KW= 28,1; p= 0,0001; Figura 7 A]. A dose de 50 mg/Kg de AF reduziu o número total de linhas cruzadas quando comparado ao controle, [CTR: 78 (51 – 131); AF 2,5: 60 (38 – 89); AF 5: 58 (35 – 93); AF 10: 65 (39 – 84); AF 50: 53 (22 – 68); KW= 9,7; p= 0,04; Figura 7 B].

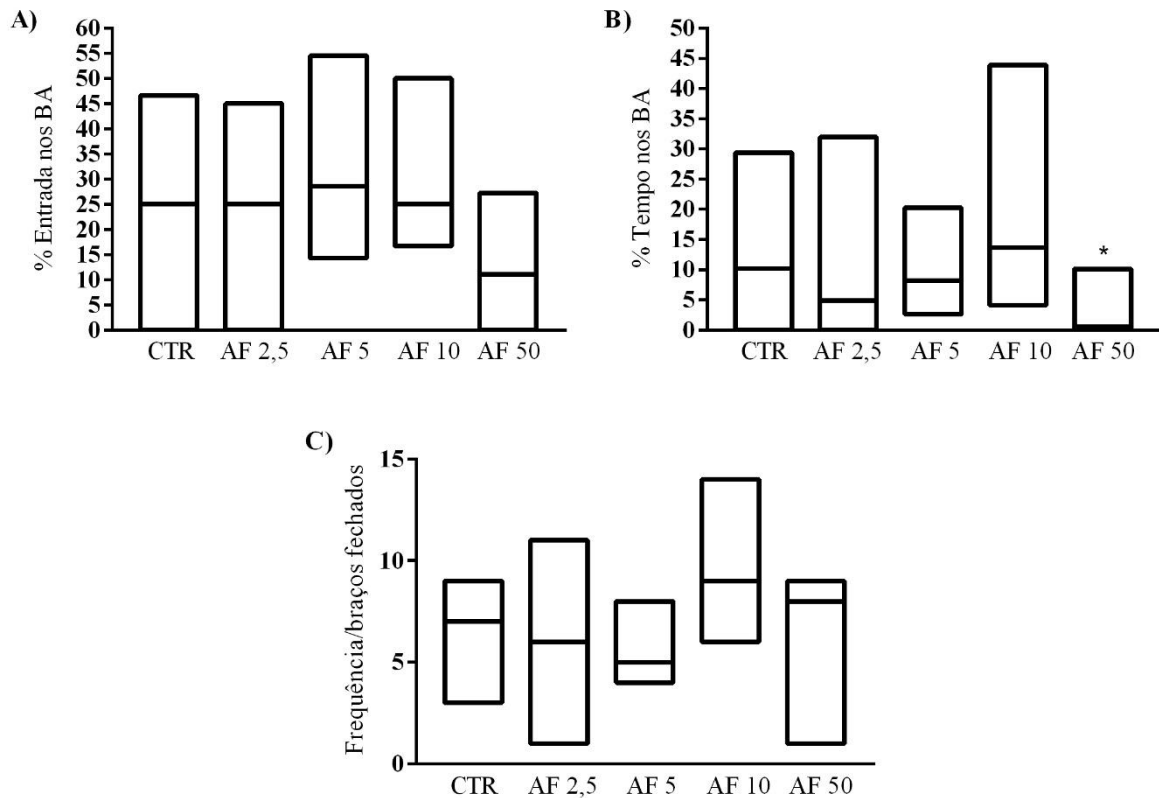


Figura 8. Efeito da administração de ácido fólico 45, 24 e 5h antes do LCE. Em (A) a porcentagem das entradas nos braços abertos, (B) a porcentagem de tempo nos braços abertos e (C) o número total de entradas dos animais nos braços fechados do LCE. AF= Ácido fólico; BA= Braços abertos; CTR= Controle (CTR n= 9; AF 2,5 n= 8; AF 5 n= 9; AF 10 n= 7; AF 50 n= 9) . Kruskal-Wallis dados expressos como mediana (mínimo-máximo); * $p < 0,05$ comparado ao controle.

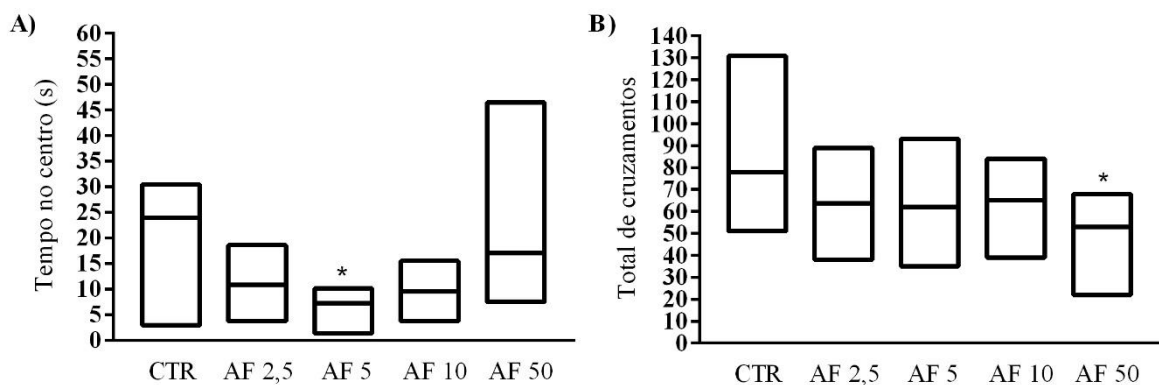


Figura 9. Efeito da administração de ácido fólico 45, 24 e 5h antes do CA. A figura (A) mostra a porcentagem do tempo gasto no centro. A figura (B) mostra o número total de cruzamentos. AF= Ácido fólico; CTR= Controle (CTR, n= 9; AF 2,5 n= 8; AF 5 n= 9; AF 10 n= 7; AF 50 n= 9). Kruskal-Wallis dados expressos como mediana (mínimo-máximo); * $p < 0,05$ comparado ao controle.

4.2 EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO REPETIDA DE AF 5 MG/KG NA CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DE CORTICOSTERONA.

A administração repetida de AF na dose de 5 mg/Kg i.p. (48, 24 e 5h antes da coleta) não alterou a concentração plasmática de corticosterona comparado ao grupo controle [CTR: 2 (1 – 3); AF 5: 3 (2 – 5); Mann-Whitney teste= 4; $p= 0,1$; Figura 8).

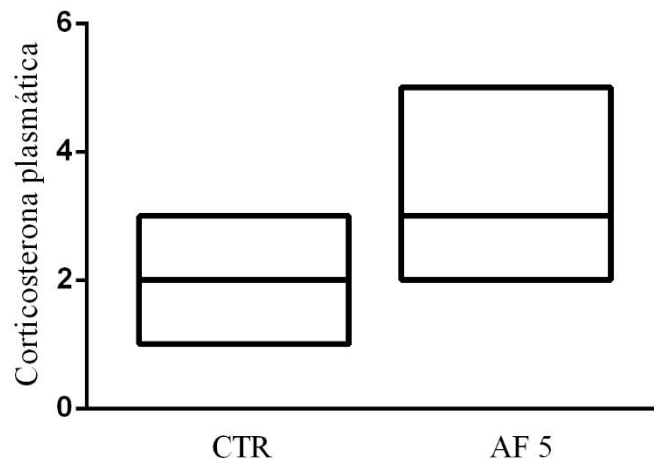


Figura 10. Efeito da administração repetida de AF 5 mg/Kg na concentração plasmática de corticosterona. CTR= Controle; AF= Ácido fólico; CTR= Controle (CTR n= 5 ; AF 5 n= 5) Mann-Whitney; dados expressos como mediana (minimo-máximo) $p>0,05$.

4.3 EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE DOSE ÚNICA DE AF EM RATOS SUBMETIDOS AO LCE E CA.

A administração de AF 5 mg/Kg ou 50 mg/Kg 1h antes do LCE não causou mudanças significativas na porcentagem de entrada [CTR: 25 (0 – 38); AF 5: 14,3 (0 – 20); AF 50: 33 (0 – 55,5); KW= 3,3; $p= 0,1$; Figura 9 A] e no tempo gasto nos braços abertos [CTR: 9,9 (0 – 21); AF 5: 1,9 (0 – 12); AF 50: 19,7 (0 – 35,7); KW= 2,4; $p= 0,2$; Figura 9 B]. A dose de AF 5mg/Kg diminuiu o número de entradas nos braços fechados [CTR: 8 (7 – 11); AF 5: 6 (2 – 8); AF 50: 6 (4 – 8); KW= 8,5; $p= 0,008$; Figura 9 C] quando comparado ao grupo controle.

No CA, a administração de AF 5 mg/Kg ou 50 mg/Kg não causou mudanças significativas no tempo gasto no centro do aparato [CTR: 9,9 (0 – 21); AF 5: 1,9 (0 – 12); AF 50: 19,7 (0 – 35,7); KW= 2,4; $p= 0,2$; 99; Figura 10 A]; mas, o número total de linhas cruzadas pelo animal foi reduzido na dose de AF 5mg/Kg em relação ao controle, e na dose de 50mg/Kg em relação ao grupo AF 5 mg/Kg [CTR: 83 (58 – 98); AF 5: 34 (24 – 50); AF 50: 69 (38 – 101); KW= 13,6; $p= 0,001$; Figura 10 B].

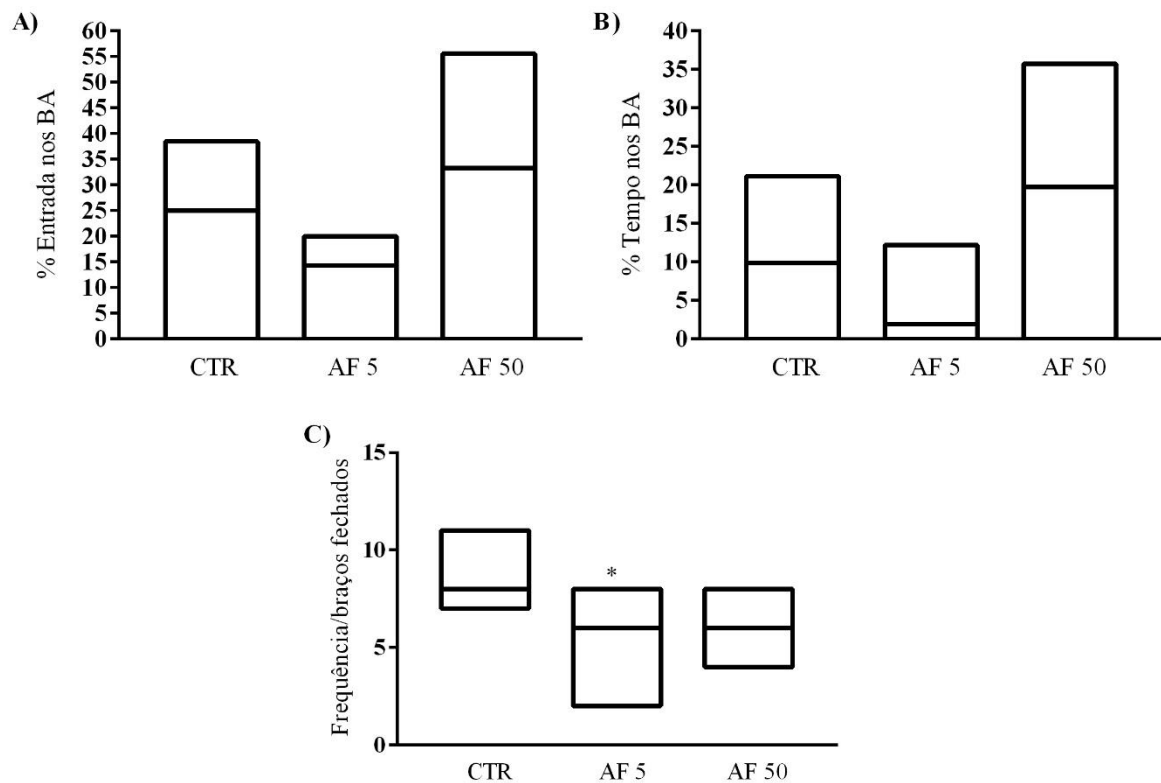


Figura 11. Efeito da administração de dose única de ácido fólico 5 ou 50 mg/Kg 1h antes do LCE. A figura (A) indica a porcentagem das entradas, (B) o tempo gasto nos braços abertos e (C) o número total de entradas nos braços fechados do LCE. AF= Ácido fólico; BA= Braços abertos; CTR= Controle (CTR n= 7; AF 5 n= 6; AF 50 n= 9). Kruskal-Wallis dados expressos como mediana (mínimo-máximo); * $p < 0,05$ comparado ao controle.

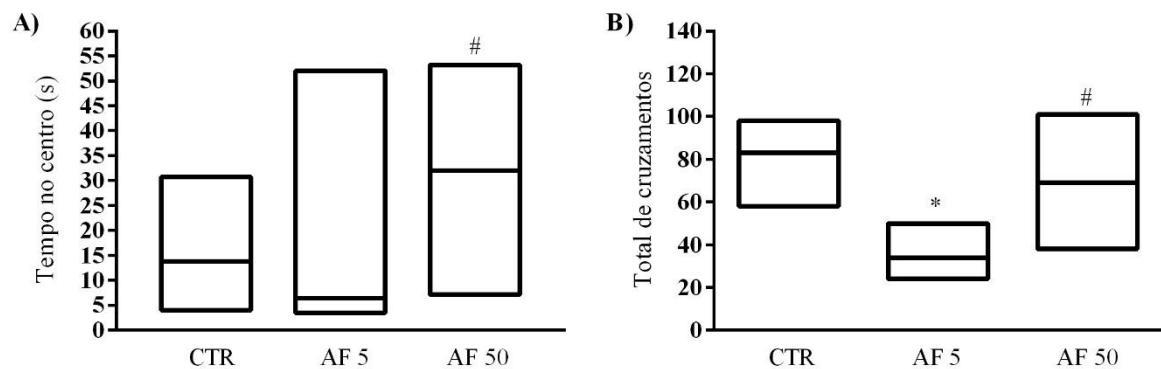


Figura 12. Efeito da administração de dose única de ácido fólico 1h antes do CA. A figura (A) indica a porcentagem do tempo gasto no centro do CA. A figura (B) indica o número total de cruzamentos. AF= Ácido fólico; CTR= Controle (CTR n= 7; AF 5 n= 6; AF 50 n= 9). Kruskal-Wallis dados expressos como mediana (mínimo-máximo); * $p < 0,05$ *comparado ao grupo controle, # comparado ao grupo AF 5.

4.4 EFEITO COMPORTAMENTAL TARDIO DO ESTRESSE DE RESTRIÇÃO AGUDO EM ANIMAIS EXPOSTOS AO LCE E AO CA .

O estresse agudo de restrição causou efeito comportamental nos animais expostos ao LCE 24h após o estresse caracterizado por uma diminuição na frequência [CTR: 28,6 (22,2 – 46,7); ESTA: 0 (0,0 – 30); $p=0,03$; Figura 11 A] e no tempo de permanência nos braços abertos do LCE [CTR: 11,7 (3,3 – 25,4); ESTA: 0 (0,0 – 10,9); $p=0,01$; Figura 11 B]. Não houve diferença na frequência nos braços fechados em relação ao controle [CTR: 7 (3 – 10); ESTA: 5 (1 – 8); $p=0,11$; Figura 11 C]. No CA, observamos diminuição significativa no tempo gasto no centro do aparato [CTR: 15,5 (7,2 – 40,8); ESTA: 7,9 (1,2 – 20,9); $p=0,01$; Figura 12 A] do grupo estresse em relação ao grupo controle, sem alteração no número total de cruzamento [CTR: 75 (43 – 108); ESTA: 66 (25 – 113); $p=0,7$; Figura 12 B].

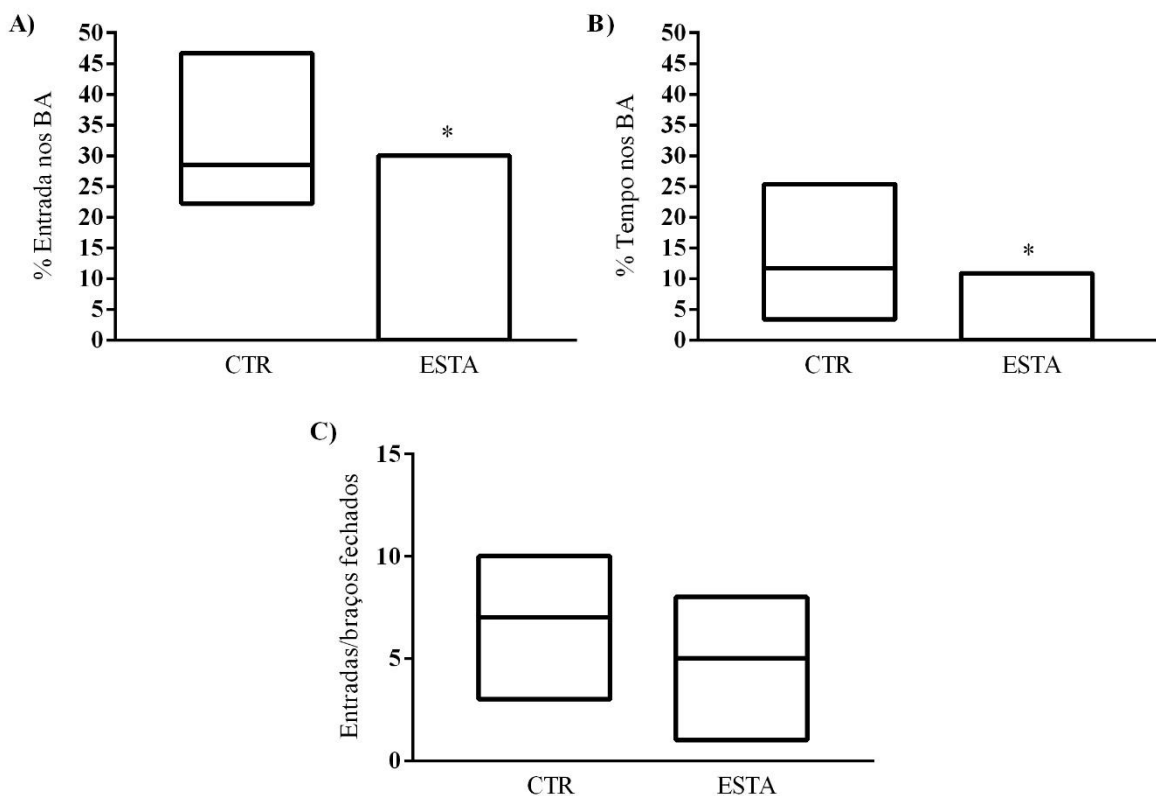


Figura 13. Efeito do estresse agudo em ratos submetidos ao LCE. A figura (A) indica a porcentagem das entradas nos braços abertos, (B) o tempo gasto nos braços abertos e (C) o número total de entradas nos braços fechados do LCE. BA= Braços abertos; CTR= Controle; ESTA= Estresse Agudo; (CTR n= 9 ; ESTA n= 9). Mann-Whitney; dados expressos como mediana (mínimo-máximo); * $p<0,05$.

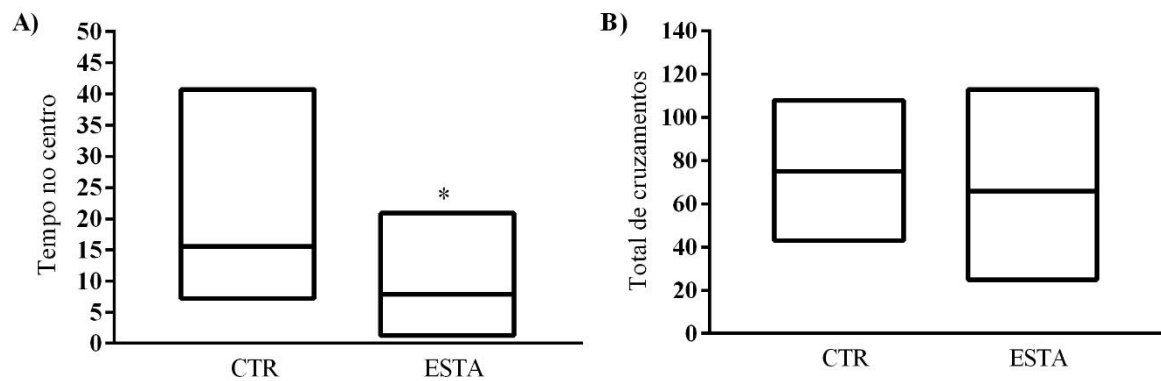


Figura 14. O Efeito do estresse agudo em ratos submetidos ao CA. A figura (A) indica a porcentagem do tempo gasto no centro do CA. A figura (B) indica o número total de cruzamentos. ESTA= Estresse Agudo; CTR= Controle (CTR n= 9; ESTA n= 9). Mann-Whitney; dados expressos como mediana (mínimo-máximo); * $p < 0,05$.

4.5 EFEITO COMPORTAMENTAL TARDIO DO ESTRESSE DE RESTRIÇÃO REPETIDO EM ANIMAIS EXPOSTOS AO LCE E AO CA.

O estresse de restrição de 2h durante 14 dias não alterou o comportamento dos animais submetidos ao LCE. Não foram observadas alterações na frequência [CTR: 30,9 (0 – 41,1); ESTR: 24,7 (0,0 – 36,3); $p = 0,6$; Figura 13 A] e tempo no braço aberto [CTR: 7,3 (0 – 23,8); ESTR: 11,1(0,0 – 30); $p = 0,8$; Figura 13 B], bem como, na frequência nos braços fechados [CTR: 4,5 (2 – 10); ESTR: 7 (4 – 9); $p = 0,5$; Figura 13 C], em relação ao grupo controle.

No CA, não foram observadas diferenças significativas no tempo gasto no centro [CTR: 12,1 (4,5 – 16); ESTR: 15,8 (5,9 – 35,6); $p = 0,3$; Figura 14 A] e no número total de cruzamento [CTR: 59,5 (51 – 72); ESTR: 53 (24 – 60); $p = 0,2$; Figura 14 B] dos animais estressados comparado ao grupo controle.

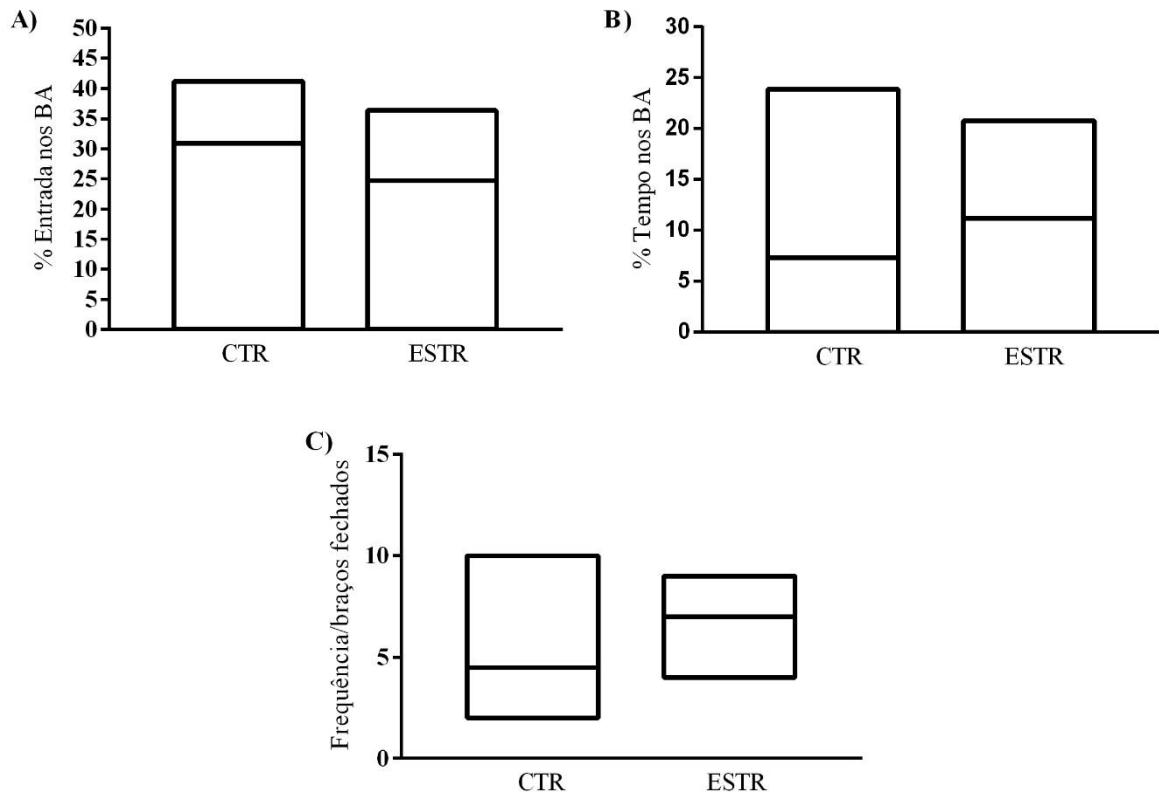


Figura 15. Efeito do estresse repetido em ratos submetidos ao LCE. A figura (A) indica a porcentagem das entradas nos braços abertos, (B) o tempo gasto nos braços abertos e (C) o número total de entradas nos braços fechados do LCE. BA= Braços abertos; CTR= Controle ESTA= Estresse Agudo; (CTR n= 6; ESTA n= 6). Mann-Whitney; dados expressos como mediana (mínimo-máximo) $p > 0,05$.

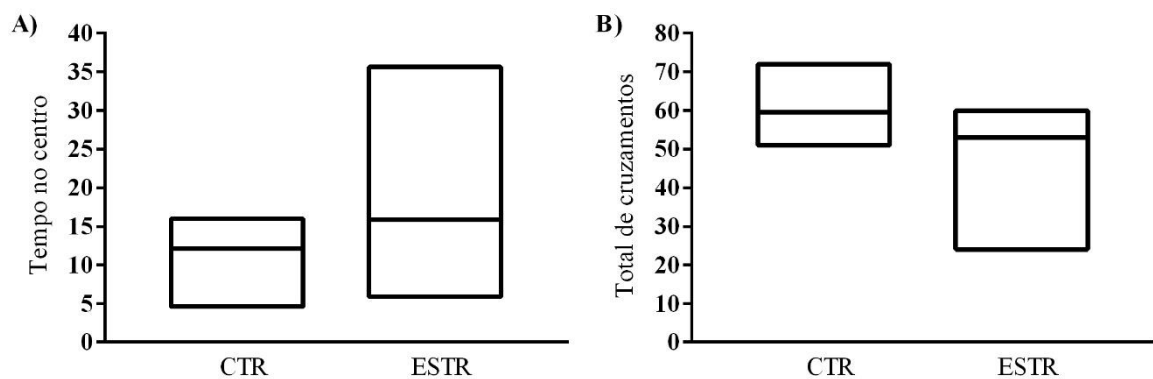


Figura 16. O Efeito do estresse repetido em ratos submetidos ao CA. A figura (A) indica a porcentagem do tempo gasto no centro do CA. A figura (B) indica o número total de cruzamentos. ESTA= Estresse Agudo; CTR= Controle (CTR n= 6; ESTR n= 5). Mann-Whitney; dados expressos como mediana (mínimo-máximo); $p > 0,05$.

4.6 EFEITO TARDIO DO ESTRESSE DE RESTRIÇÃO AGUDO E REPETIDO NA CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DE CORTICOSTERONA

Não foi observada diferença na concentração plasmática de corticosterona dos animais 24h após o término do estresse agudo ou repetido quando comparado ao grupo controle [CTR: 2 (2 – 5); ESTA: 2 (1 – 4); ESTR: 2 (1 – 4); KW= 1,2; p= 0,5; Figura 15].

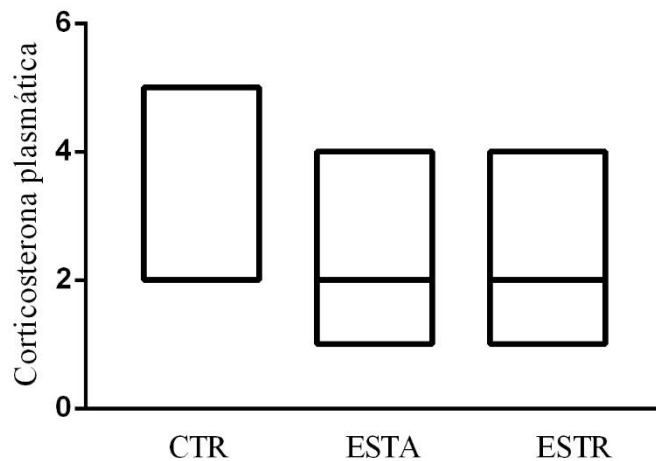


Figura 17. Efeito tardio do estresse na concentração plasmática de corticosterona. CTR= Controle; ESTA= estresse agudo; ESTR= estresse repetido; (CTR n= 5 ; ESTA n= 5 ; ESTR n= 5) Kruskal-Wallis; dados expressos como mediana (mínimo-máximo); p>0,05.

4.7 EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO REPETIDA DE AF EM RATOS SUBMETIDOS PREVIAMENTE AO ESTRESSE AGUDO DE RESTRIÇÃO.

O AF nas doses de 2,5, 5, 10 ou 50 mg/Kg i.p. 48, 24 e 5h antes do LCE não interferiu na porcentagem de entrada [CTR: 30,9 (0 – 41,1); ESTR: 24,7 (13,6 – 36,3); Figura 16 A] e no tempo gasto nos braços abertos [CTR: 7,3 (0 – 23,8); ESTR: 11,1 (0 – 20,8); Figura 16 B], assim como, nas entradas dos braços fechados [CTR: 4,5 (2 – 10); ESTR: 7 (4 – 9); Figura 16 C] comparados ao grupo controle.

No CA, também não foram observadas mudanças significativas no tempo gasto no centro do aparato [CTR: 12,1 (4,6 – 16); ESTR: 15,8 (5,9 – 35,6); Figura 17 A] e no número total de cruzamentos [CTR: 59,5 (51 – 72); ESTR: 53 (24 – 60); Figura 17 B].

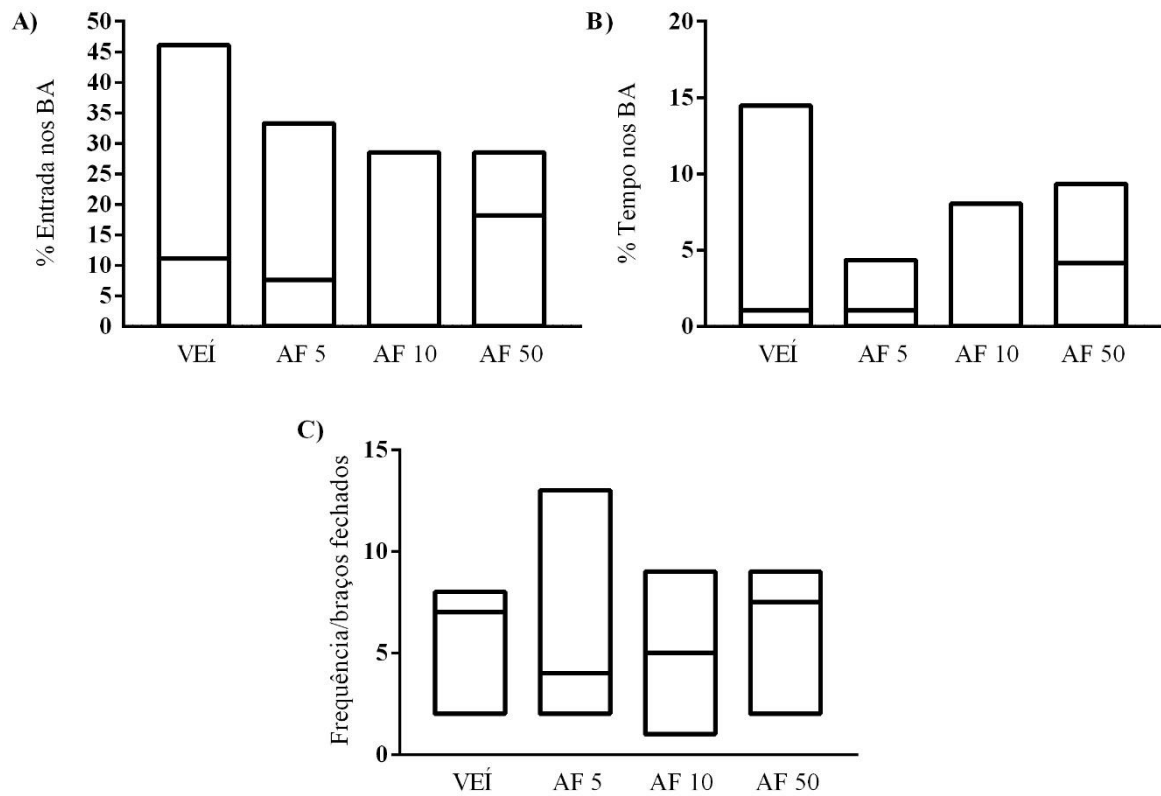


Figura 18. Efeito da administração de ácido fólico 45, 24 e 5h antes do LCE em ratos previamente estressados. A figura (A) indica a porcentagem das entradas, (B) o tempo gasto nos braços abertos e (C) o número total de entradas nos braços fechados. AF= Ácido fólico; BA= Braços abertos; CTR= Controle (CTR n= 9; AF 5 n= 8; AF 10 n= 8; AF 50 n= 8). Kruskal-Wallis dados expressos como mediana (mínimo-máximo); $p > 0,05$ comparado ao controle.

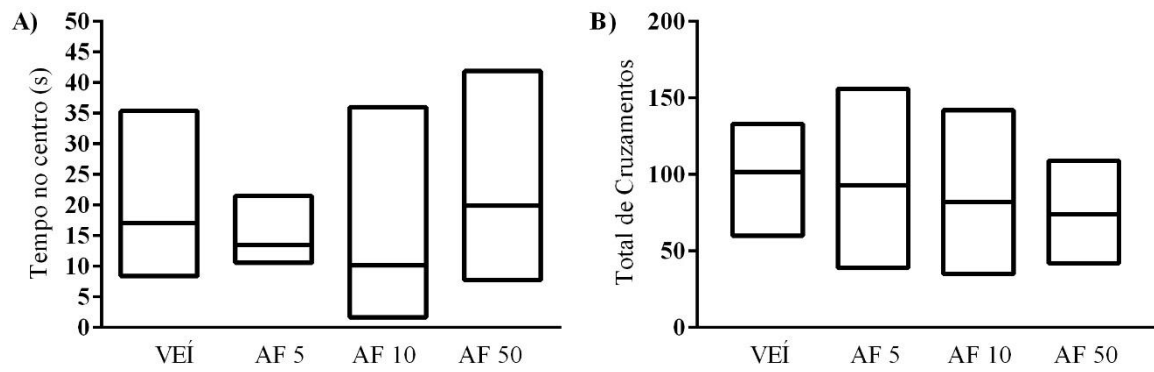


Figura 19. Efeito da administração de ácido fólico 45, 24 e 5h antes do CA em ratos previamente estressados. A figura (A) mostra a porcentagem do tempo gasto no centro. A figura (B) mostra o número total de cruzamentos. AF= Ácido fólico; CTR= Controle (CTR n= 8; AF 5 n= 9; AF 10= 9; AF 50 n= 7). Kruskal-Wallis dados expressos como mediana (mínimo-máximo); $p > 0,05$ comparado ao controle.

5 DISCUSSÃO

A administração repetida de AF na dose de 50mg/Kg diminuiu o tempo despendido nos braços abertos do LCE sem alterar a frequência dos braços fechados, no entanto, quando esses animais foram submetidos ao CA apresentaram uma diminuição no número total de cruzamentos, o que indica que o comportamento observado no LCE seja devido a uma alteração na atividade locomotora causada pelo AF. No CA a dose de AF 5mg/Kg diminuiu o tempo em que os animais permaneceram na região central do aparato sem alterar o número total de cruzamentos, o que indica um comportamento ansiogênico desprovido de alteração locomotora.

Com base no efeito ansiogênico verificamos a concentração plasmática de corticosterona 5h após a última administração da dose de AF 5mg/Kg e vimos que não houve diferença entre os grupos, o que nos sugere que o comportamento ansioso observado seja devido a outros mecanismos ou que uma adaptação do eixo HPA tenha ocorrido em menos de 5h após a administração de AF.

Sabe-se que ambos os testes respondem a drogas ansiolíticas e ansiogênicas (PELLOW; FILE, 1986b; PRUT; BELZUNG, 2003), no entanto, vimos uma resposta ansiogênica apenas no CA. ANCHAN et al., (2014) também observou resposta comportamental somente em um dos testes, fêmeas ovariectomizadas e tratadas com G-1 (agonista seletivo de receptor de estrogênio, GPR30) tiveram efeito ansiolítico no CA, sem alteração comportamental durante exposição ao LCE o que aponta para diferente sensibilidade dos testes.

A existência da plataforma central do LCE e a oportunidade de escolha que esse aparato oferece entre as áreas protegidas e desprotegidas pode contribuir para a diversidade comportamental entre os modelos (DE LACERDA, 2006).

Além disto, uma análise fatorial mostrou que a locomoção central no CA não foi associada a nenhuma das variáveis do LCE como tempo e frequência no braço aberto e frequência no braço fechado (RAMOS et al., 1998). Este resultado apoia a idéia de que os vários modelos etológicos de ansiedade não são uma entidade unidimensional, e que apesar de sua semelhança, refletem diferentes aspectos da emotividade o que vai de encontro a natureza multifatorial da ansiedade clínica (LACERDA, 2006; RAMOS, 2008).

Nosso trabalho é o primeiro a avaliar o efeito do AF durante a vida adulta nos testes de LCE e CA. Camundongos expostos à dieta AF (4 mg/kg ou 0,4 mg/kg) durante a gestação ou pós-desmame, não tiveram diferença no percentual de tempo e entrada dos braços abertos

no LCE quando adultos, mas no CA foi observado uma hiperatividade no início do teste (BARUA et al., 2014).

Em indivíduos saudáveis o AF administrado nas doses de 10 mg e 20 mg não causou melhora na avaliação de humor feito pela escala de afeto positivo e negativo (WILLIAMS et al., 2005). No entanto, evidências relatam o papel benéfico do AF na depressão, patologia que têm alta comorbidade com a ansiedade (BROCARD et al., 2008b; KESSLER; GRUBER, 2008). Sabe-se que o AF pode potencializar o efeito de medicamentos antidepressivos, após 6 semanas de tratamento com fluoxetina combinada com AF os pacientes tiveram uma melhor resposta na Escala de Depressão de Hamilton comparado aos pacientes que receberam fluoxetina e placebo (COPPEN; BAILEY, 2000; RESLER et al., 2008).

Em modelo animal, a administração única de AF sistemicamente ou intra septo lateral causou comportamento semelhante ao antidepressivo no teste de natação forçada e no teste de suspensão da cauda (BROCARD et al., 2008b; MOLINA-HERNÁNDEZ et al., 2012).

A diferença de efetividade do AF na patologia de ansiedade e depressão pode estar associada as diferentes vias neurais que modulam estas psicopatologias. Enquanto os núcleos septais laterais e núcleo mediano da rafe estão associados à depressão (GRAEFF et al., 1996; MOLINA-HERNÁNDEZ et al., 2012), o córtex frontal, septo-hipocampal, a amígdala e SCP tem sido implicado na neurobiologia da ansiedade (CANTERAS; GRAEFF, 2014; MCNAUGHTON; GRAY, 2000).

Em um terceiro momento verificamos se a única administração de AF poderia modular o comportamental no LCE e CA e observamos que o AF não causou alteração nas respostas relacionadas a ansiedade e nenhum dos testes, o que nos indica que são necessárias administrações repetidas para observarmos um efeito comportamental. Os mecanismos subjacentes a esse fenômeno são desconhecidos, no entanto, mudanças moleculares no sistema nervoso central são provavelmente necessárias para o seu desenvolvimento.

Na dose única de AF 5 mg/Kg foi observada diminuição no número total de cruzamentos no CA, que está relacionada a uma alteração na atividade motora. Sedativos e relaxantes musculares são conhecidos por reduzirem a atividade locomotora no CA (MATAQUEIRO et al., 2004; OH et al., 2019).

Sabe-se que o AF é um importante cofator da via de biossíntese da SAM, principal doador do radical metila (CH₃) para o processo de metilação do DNA (GOMES; PELOSI, 2013), um importante mecanismo epigenético. Desta forma, ao induzir a hipermetilação de

regiões promotoras, ricas em dinucleotídeos CsG, pode causar o silenciamento da transcrição gênica (BOTTIGLIERI et al., 2000).

Aumento da metilação de DNA em estruturas encefálicas como hipocampo, hipotálamo e substância cinzenta periaquedutal dorsal foram observadas após tratamento com AF (TOFFOLI et al., 2014). Amostra de estudo clínico de pacientes com sintomas de ansiedade mostrou um aumento da metilação global de DNA (EMENY et al., 2017). Além disto, mecanismos epigenéticos podem ser associados a alteração na expressão genica de DNMTs no córtex de vítimas de suicídio (POULTER et al., 2008). Diante disso, é possível que o AF exerça seu papel modulatório na ansiedade através dos mecanismos epigenéticos; entretanto, outros estudos são necessários para confirmar essa hipótese.

Além da sua participação na metilação do DNA, o AF é importante para a biossíntese de catecolaminas; assim, outro possível mecanismo pode ser a ligação entre o metabolismo do folato e da tetraidrobiopterina, um cofator necessário na síntese do triptofano, da tirosina hidroxilase e da NO-sintase, que determinam a produção de serotonina, dopamina e óxido nítrico, neuromoduladores implicados na gênese do transtorno de ansiedade (BOTTIGLIERI et al., 2000).

A administração de AF restaurou a concentração de serotonina em ratos previamente estressados (GAO et al., 2017). É pertinente a idéia de que o AF possa ter causado alterações comportamentais através de alterações neuroquímicas, no entanto, mais estudos são necessários para confirmar esta hipótese.

Do ponto de vista translacional, o fato da administração sistêmica de 3 doses de AF não apresentar efeitos benéficos na terapia de ansiedade questiona o risco do seu uso excessivo. Com o início da fortificação com AF no Brasil, a partir de 2004, a população passou a estar exposta de modo compulsório a maiores quantidades desta vitamina, concentrações de folato superiores a 45 nmol/L são consideradas suprafisiológicas e após o período de fortificação de farinhas, tais concentrações foram observadas em 23% da população norte-americana (SMITH; KIM; REFSUM, 2008). Neste sentido, vários países tem discutido o risco do aparecimento de concentrações elevadas no organismo.

Ainda no presente trabalho, a exposição a situação de estresse agudo induziu diminuição na atividade exploratória dos braços abertos do LCE, assim como, diminuição no tempo gasto no centro do CA pelos animais o que caracteriza uma resposta semelhante à ansiedade, sem alteração na atividade locomotora.

Esses resultados corroboram com dados prévios da literatura que demonstram que o estresse de restrição de 2h causa um efeito ansiogênico-símile em ambos os testes, LCE e CA (CARLI; PRONTERA; SAMANIN, 1989; LEE et al., 2012).

Nossos achados apoiam a idéia de que experiências estressantes prévias podem aumentar a ansiedade quando o animal é confrontado com uma nova situação ameaçadora, representada pelo aspecto inovador do LCE e CA (CAMPOS et al., 2013; MASOOD et al., 2003).

Com relação ao estresse de restrição repetido, nenhuma mudança na atividade exploratória do LCE ou CA foram identificadas. Estudos anteriores também não identificaram alterações no LCE e CA em ratos submetidos ao estresse repetido sugerindo o desenvolvimento de tolerância/habituação desses animais (DUBOVICKY; JEZOVA, 2004; DUNČKO et al., 2001; PADOVAN; GUIMARÃES, 2000; VYAS; CHATTARJI, 2004).

A habituação é uma forma de aprendizagem não associativa simples, na qual o volume da resposta a um estímulo específico diminui com a exposição repetida a esse estímulo. Representa um mecanismo compensatório que atenua os efeitos deletérios do estresse repetido e tenta manter a homeostase do organismo (RANKIN et al., 2009).

Adaptação a estímulos estressantes pode envolver a ação do sistema serotoninérgico como sugerido por DEAKIN E GRAEFF (1991) onde a via prosencefálica que conecta o núcleo mediano da rafe ao hipocampo modularia respostas desencadeadas por eventos aversivos repetidos aumentando a tolerância ou resistência ao estresse crônico. Nesse sentido, lesões neurotóxicas dos neurônios serotoninérgicos que surgem do núcleo mediano da rafe e que se projetam para o hipocampo dorsal atenuam os efeitos do estresse agudo, ao mesmo tempo em que dificultam o desenvolvimento da tolerância à exposição crônica (SILVA; CARVALHO; PADOVAN, 2016).

No entanto, os resultados relativos ao estresse crônico são conflitantes, com relatos de nenhuma mudança ou atividade comportamental reduzida (KIM; LEEM, 2014; LEE et al., 2012; VYAS; CHATTARJI, 2004). Em camundongo, o estresse durante 14 dias levou a uma diminuição no tempo e frequência do braço aberto do LCE, um efeito ansiogênico-símile (KIM; LEEM, 2014; LEE et al., 2012). Um efeito ansiogênico também foi relatado frente a exposição do modelo de estresse crônico de imobilização (VYAS; CHATTARJI, 2004).

Uma possível explicação para os diferentes resultados é que a espécie, quantidade e duração dos estímulos estressantes são determinantes para que o estresse crônico influencie na resposta comportamental dos animais à novos ambientes. Sendo assim, a metodologia aplicada não representa um fator de risco para alterações permanentes nos processos de habituação.

Não observamos diferença significativa nas concentrações tardias de corticosterona no grupo estresse agudo e estresse repetido em relação ao grupo controle, o que sugere uma adaptação do eixo HPA em menos de 24h após o estresse, ao mesmo tempo em que o estresse agudo provoca um aumento na sensibilidade das respostas aversivas à ambientes novos.

Corroborando com nossos resultados, um estudo temporal dos níveis plasmáticos de corticosterona revelou que a elevação dos níveis plasmáticos deste hormônio causado pelo estresse agudo, subcrônico e crônico foram mantidos por 5h e então reduzem (DE KLOET; KARST; JOËLS, 2008). Porém, outro estudo mostrou que a concentração de corticosterona se manteve aumentada mesmo 24h após o estresse agudo (CARDA et al., 2015).

Quanto ao estresse crônico, estudos anteriores também não identificaram mudanças na secreção basal de corticosterona (LEE et al., 2012; SANDI et al., 2001).

Por fim, a administração de AF em ratos submetidos ao estresse agudo de restrição não alterou o tempo de permanência e frequência de entradas nos braços abertos e frequência no braço fechado em ratos submetidos ao LCE. Da mesma forma, não foram observadas diferenças no tempo gasto na região central e no total de cruzamentos analisados no CA.

Sabe-se que a exposição ao estresse pode induzir a alterações neuronais como atrofia e remodelação dendrítica, e alterações moleculares como aumento da expressão do gene BDNF e hipometilação do DNA (RAO et al., 2012; RODRIGUES et al., 2015; VYAS et al., 2002). Complementarmente, o AF é capaz de gerar respostas proliferativas das células-tronco neurais, que desempenha um papel crítico no desenvolvimento, função e reparo do sistema nervoso central, através de DNMT (LI et al., 2013). Assim como, induzir ao aumento na metilação do DNA. Contudo, em nosso modelo experimental o AF não foi capaz de alterar as alterações comportamentais induzidas pelo estresse de restrição.

Ratos submetidos ao estresse crônico variável mostraram uma diminuição de BDNF no córtex e hipocampo acompanhado de comportamento depressivo, o tratamento com AF reverteu o quadro depressivo e aumentou a concentração de BDNF comparado ao controle. (GAO et al., 2017). No entanto, o AF não foi capaz de proteger o comprometimento cognitivo induzido pelo estresse de retenção (BUDNI et al., 2013).

Em suma, o presente trabalho evidenciou o efeito ansiogênico do AF nas respostas comportamentais causadas pelo exposição do animal ao CA, além de mostrar seu envolvimento na modulação da atividade locomotora

6 CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou que o AF causa um efeito ansiogênico observado no CA, porém, não tem efeito sobre o comportamento de ansiedade-símile causado pela situação prévia de estresse sugerindo que o AF interfere na neurobiologia da ansiedade; entretanto, outros estudos são necessários para entender quais os mecanismos envolvidos nessa modulação e, dessa forma, permitir o avanço no estudo de novos compostos para o tratamento da ansiedade, assim como, de potenciais marcadores moleculares para complementar e facilitar o diagnóstico de ansiedade.

7 REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, C. C. et al. Redução dos níveis séricos de ácido fólico em pacientes com a doença de Alzheimer. **Archives of Clinical Psychiatry (São Paulo)**, v. 39, n. 3, p. 90–93, 2012.
- AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. **Diagnostic and statistical manual of mental disorders 5th ed.** [s.l.: s.n.].
- ANCHAN, D. et al. GPR30 activation decreases anxiety in the open field test but not in the elevated plus maze test in female mice. **Brain and Behavior**, v. 4, n. 1, p. 51–59, 2014.
- ANDRADE, C. S.; GUIMARÃES, F. S. Anxiolytic-like effect of group housing on stress-induced behavior in rats. **Depression and Anxiety**, v. 18, n. 3, p. 149–152, nov. 2003.
- BAILEY, L. B. et al. Biomarkers of Nutrition for Development— Folate Review 1–5. **The Journal of Nutrition**, n. C, p. 1–45, 2015.
- BALAGHI, M.; WAGNER, C. DNA Methylation in Folate Deficiency: Use of CpG Methylase. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 193, n. 3, p. 1184–1190, 30 jun. 1993.
- BANDELOW, B. et al. The diagnosis and treatment of generalized anxiety disorder. **Deutsches Ärzteblatt international**, v. 110, n. 17, p. 300–9; quiz 310, 2013.
- BANDELOW, B.; MICHAELIS, S. Epidemiology of anxiety disorders in the 21st century. **Dialogues in Clinical Neuroscience**, v. 17, n. 3, p. 327–335, 2015.
- BARUA, S. et al. Increasing maternal or post-weaning folic acid alters gene expression and moderately changes behavior in the offspring. **PLoS ONE**, v. 9, n. 7, 2014.
- BLANCHARD, D. C.; BLANCHARD, R. J. Ethoexperimental approaches to the biology of emotion. **Annual review of psychology**, v. 39, n. 1, p. 43–68, jan. 1988.
- BOTTIGLIERI, T. et al. Homocysteine, folate, methylation, and monoamine metabolism in depression. **Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry**, v. 69, n. 2, p. 228–32, ago. 2000.
- BRAGA, J. E. F. Ansiedade Patológica: Bases Neurais E Avanços Na Abordagem Psicofarmacológica. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, v. 14, n. 2, p. 93–100, 2010.
- BRANDÃO, M. L. et al. Neural organization of different types of fear: implications for the understanding of anxiety. **Revista brasileira de psiquiatria (Sao Paulo, Brazil : 1999)**, v. 25 Suppl 2, n. Supl II, p. 36–41, 2003.
- BRASIL. RESOLUÇÃO Nº 150. **MINISTÉRIO DA SAÚDE**, p. nº 73, Seção 1, pág. 37, 2017.

- BRITO, A. et al. Folate, vitamin B12 and human health. **Revista médica de Chile**, v. 140, n. 11, p. 1464–1475, 2012.
- BRITO NORONHA, M. et al. Undernutrition, Serum Vitamin B12, Folic Acid and Depressive Symptoms in Older Adults. **Nutrición hospitalaria**, v. 32, n. 1, p. 354–61, 2015.
- BROCARD, P. DE S. et al. Antidepressant-like effect of folic acid: Involvement of NMDA receptors and L-arginine-nitric oxide-cyclic guanosine monophosphate pathway. **European journal of pharmacology**, v. 598, n. 1–3, p. 37–42, 19 nov. 2008a.
- BROCARD, P. S. et al. Folic acid administration produces an antidepressant-like effect in mice: Evidence for the involvement of the serotonergic and noradrenergic systems. **Neuropharmacology**, v. 54, n. 2, p. 464–473, fev. 2008b.
- BUDNI, J. et al. Folic acid prevents depressive-like behavior and hippocampal antioxidant imbalance induced by restraint stress in mice. **Experimental Neurology**, v. 240, n. 1, p. 112–121, 2013.
- CAMPOS, A. C. et al. Animal models of anxiety disorders and stress. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 35, n. SUPPL.2, p. 101–111, 2013.
- CANTERAS, N. S.; GRAEFF, F. G. Executive and modulatory neural circuits of defensive reactions: Implications for panic disorder. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 46, n. P3, p. 352–364, 2014.
- CARDA, A. P. P. et al. Acute restraint stress induces endothelial dysfunction: role of vasoconstrictor prostanoids and oxidative stress. **Stress**, v. 18, n. 2, p. 233–243, 4 mar. 2015.
- CARLI, M.; PRONTERA, C.; SAMANIN, R. Effect of 5-HT_{1A} agonists on stress-induced deficit in open field locomotor activity of rats: Evidence that this model identifies anxiolytic-like activity. **Neuropharmacology**, 1989.
- CAROLINE BLANCHARD, D. et al. Human defensive behaviors to threat scenarios show parallels to fear- and anxiety-related defense patterns of non-human mammals. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 25, n. 7–8, p. 761–770, 2001.
- CARRASCO, G. A.; VAN DE KAR, L. D. Neuroendocrine pharmacology of stress. **European Journal of Pharmacology**, v. 463, n. 1–3, p. 235–272, 2003.
- CHOLERIS, E. et al. A detailed ethological analysis of the mouse open field test: Effects of diazepam, chlordiazepoxide and an extremely low frequency pulsed magnetic field. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, 2001.
- COLLINS, A. et al. Exercise improves cognitive responses to psychological stress through

enhancement of epigenetic mechanisms and gene expression in the dentate gyrus. **PloS one**, v. 4, p. e4330, 2009.

COPPEN, A.; BAILEY, J. Enhancement of the antidepressant action of fluoxetine by folic acid : a randomised , placebo controlled trial. v. 60, p. 121–130, 2000.

CRUZ, A. P. DE M.; LANDEIRA-FERNANDEZ, J. Modelos animais de ansiedade e o estudo experimental de drogas serotoninérgicas. **Métodos em Neurociência**, p. 192–217, 2012.

DE ANDRADE, J. S. et al. Effects of acute restraint and unpredictable chronic mild stress on brain corticotrophin releasing factor mRNA in the elevated T-maze. **Behavioural Brain Research**, v. 337, n. June 2017, p. 139–150, 2018.

DE KLOET, E. R.; KARST, H.; JOËLS, M. Corticosteroid hormones in the central stress response: Quick-and-slow. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 29, n. 2, p. 268–272, 2008.

DE LACERDA, G. F. M. **Ansiedade em modelos animais: efeito de drogas nas dimensões extraídas da análise fatorial**. [s.l.] Universidade Federal do Paraná, 2006.

DEAKIN, J. F. W.; GRAEFF, F. G. **5-HT and mechanisms of defence. Author's response** **Journal of Psychopharmacology**, 1991.

DJUKIC, A. Folate-Responsive Neurologic Diseases. **Pediatric Neurology**, v. 37, n. 6, p. 387–397, 2007.

DSM V, A. P. A. **Manual diagnóstico e estatístico de transtornos mentais: DSM-5**. Artmed ed. [s.l.: s.n.].

DUBOVICKY, M.; JEZOVA, D. Effect of chronic emotional stress on habituation processes in open field in adult rats. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1018, p. 199–206, jun. 2004.

DUNČKO, R. et al. Corticotropin-releasing hormone mRNA levels in response to chronic mild stress rise in male but not in female rats while tyrosine hydroxylase mRNA levels decrease in both sexes. **Psychoneuroendocrinology**, v. 26, n. 1, p. 77–89, jan. 2001.

ECKART, S. et al. Reduced nerve growth factor levels in stress-related brain regions of folate-deficient mice. **Neuroscience**, v. 245, p. 129–135, 2013.

EMENY, R. T. et al. Anxiety Associated Increased CpG Methylation In The Promoter of Asb1: A Translational Approach Evidenced By Epidemiological And Clinical Studies And A Murine Model. **Neuropsychopharmacology**, v. 43, n. 2, p. 342–353, 2017.

FERREIRA, C. et al. Prevalence of anxiety disorders as a cause of workers' absence. **Revista Brasileira de Enfermagem**, v. 71, n. suppl 5, p. 2344–2351, 2018.

FRANÇA, V. F. **INDICADORES DE HÁBITOS ALIMENTARES NÃO SAUDÁVEIS, CONCENTRAÇÃO SÉRICA DAS VITAMINAS B12, ÁCIDO FÓLICO E A COGNIÇÃO EM IDOSOS DE FLORIANÓPOLIS.** [s.l.] Universidade Federal de Santa Catarina, 2016.

GAO, L. et al. Folic acid exerts antidepressant effects by upregulating brain-derived neurotrophic factor and glutamate receptor 1 expression in brain. **NeuroReport**, v. 28, n. 16, p. 1078–1084, nov. 2017.

GOMES, M. V. DE M.; PELOSI, G. G. Epigenetic vulnerability and the environmental influence on health. **Experimental biology and medicine (Maywood, N.J.)**, v. 238, n. 8, p. 859–65, 1 ago. 2013.

GRAEFF, F. G. Neuroanatomy and neurotransmitter regulation of defensive behaviors and related emotions in mammals. **Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas**, v. 27, n. 4, p. 811–29, abr. 1994.

GRAEFF, F. G. et al. Role of 5-HT in stress, anxiety, and depression. **Pharmacology, biochemistry, and behavior**, v. 54, n. 1, p. 129–41, maio 1996.

GRAEFF, F. G. On serotonin and experimental anxiety. p. 467–476, 2002.

GRAEFF, F. G.; HETEM, L. A. B. **Transtornos da Ansiedade.** 2. ed. São Paulo: Atheneu, 2012.

HAZIM, A. I. et al. Anxiolytic-like effects of mitragynine in the open-field and elevated plus-maze tests in rats. **Journal of Physiological Sciences**, v. 64, n. 3, p. 161–169, 2014.

KATZ, R. J.; ROTH, K. A.; CARROLL, B. J. Acute and chronic stress effects on open field activity in the rat: Implications for a model of depression. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 5, n. 2, p. 247–251, 1981.

KEAY, K. A.; BANDLER, R. Parallel circuits mediating distinct emotional coping reactions to different types of stress. v. 25, n. 2001, 2006.

KESSLER, R. C. et al. The global burden of mental disorders: an update from the WHO World Mental Health (WMH) surveys. **Epidemiologia e psichiatria sociale**, v. 18, n. 1, p. 23–33, 2011.

KESSLER, R.; GRUBER, M. Co-morbid major depression and generalized anxiety disorders in the National Comorbidity Survey follow-up. **Psychological Medicine**, v. 38, n. 3, p. 365–374, 2008.

KIM, M. H.; LEEM, Y. H. Chronic exercise improves repeated restraint stress-induced anxiety

and depression through 5HT1A receptor and cAMP signaling in hippocampus. **J Exerc Nutr Biochem**, v. 18, n. 1, p. 97–104, 2014.

KREIBIG, S. D. Autonomic nervous system activity in emotion: A review. **Biological Psychology**, v. 84, n. 3, p. 394–421, jul. 2010.

KRONENBERG, G.; COLLA, M.; ENDRES, M. Folic Acid, Neurodegenerative and Neuropsychiatric Disease. **Current Molecular Medicine**, v. 9, n. 3, p. 315–323, 2009.

LAPMANEE, S. et al. Anxiolytic-like actions of reboxetine, venlafaxine and endurance swimming in stressed male rats. **Behavioural Brain Research**, v. 231, n. 1, p. 20–28, 2012.

LEE, B. et al. Bupleurum falcatum prevents depression and anxiety-like behaviors in rats exposed to repeated restraint stress. **Journal of microbiology and biotechnology**, v. 22, n. 3, p. 422–430, 2012.

LI, W. et al. DNA methyltransferase mediates dose-dependent stimulation of neural stem cell proliferation by folate. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 24, n. 7, p. 1295–1301, 2013.

LINO-DE-OLIVEIRA, C. et al. Effects of acute and chronic fluoxetine treatments on restraint stress-induced Fos expression. **Brain Research Bulletin**, v. 55, n. 6, p. 747–754, ago. 2001.

LISTER, R. G. Ethologically-based animal models of anxiety disorders. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 46, n. 3, p. 321–340, jan. 1990.

MACHADO, V. S. et al. Diphenyl diselenide supplementation in infected mice by *Toxoplasma gondii*: Protective effect on behavior, neuromodulation and oxidative stress caused by disease. **Experimental Parasitology**, v. 169, p. 51–58, 2016.

MARIN, M. T.; CRUZ, F. C.; PLANETA, C. S. Chronic restraint or variable stresses differently affect the behavior, corticosterone secretion and body weight in rats. **Physiology and Behavior**, v. 90, n. 1, p. 29–35, 2007.

MASOOD, A. et al. Modulation of stress-induced neurobehavioral changes by nitric oxide in rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 458, n. 1–2, p. 135–139, 2003.

MATAQUEIRO, M. I. et al. Comparative study of the sedative and antinociceptive effects of levomepromazine, azaperone and midazolam in laboratory animals. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 56, n. 3, p. 340–345, jun. 2004.

MATTÉ, C. et al. Folic acid pretreatment prevents the reduction of Na⁺,K⁺-ATPase and butyrylcholinesterase activities in rats subjected to acute hyperhomocysteinemia. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 24, n. 1, p. 3–8, 2006.

MATTSON, M. P.; SHEA, T. B. Folate and homocysteine metabolism in neural plasticity and

neurodegenerative disorders. **Trends in neurosciences**, v. 26, n. 3, p. 137–46, mar. 2003.

MCEWEN, B. S. Physiology and Neurobiology of Stress and Adaptation: Central Role of the Brain. **Physiological Reviews**, v. 87, n. 3, p. 873–904, jul. 2007.

MCNAUGHTON, N.; CORR, P. J. A two-dimensional neuropsychology of defense: fear/anxiety and defensive distance. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 28, n. 3, p. 285–305, maio 2004.

MCNAUGHTON, N.; GRAY, J. A. Anxiolytic action on the behavioural inhibition system implies multiple types of arousal contribute to anxiety. **Journal of affective disorders**, v. 61, n. 3, p. 161–76, dez. 2000.

MCNULTY, H. et al. Nutrition Throughout Life: Folate. **International Journal for Vitamin and Nutrition Research**, v. 82, n. 5, p. 348–354, out. 2012.

MCNULTY, H.; PENTIEVA, K. Folate Bioavailability. In: **Folate in Health and Disease, Second Edition**. [s.l: s.n.].

MOLINA-HERNÁNDEZ, M. et al. Intra-lateral septal infusions of folic acid alone or combined with various antidepressant drugs produce antidepressant-like actions in male Wistar rats forced to swim. **Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry**, v. 36, n. 1, p. 78–84, 10 jan. 2012.

MOLLOY, A. M. et al. Effects of Folate and Vitamin B 12 Deficiencies During Pregnancy on Fetal, Infant, and Child Development. **Food and Nutrition Bulletin**, v. 29, n. 2_suppl1, p. S101–S111, 22 jun. 2008.

MORRIS, M. S. et al. Folate and vitamin B-12 status in relation to anemia, macrocytosis, and cognitive impairment in older Americans in the age of folic acid fortification. **American Journal of Clinical Nutrition**, 2007.

NASHOLD, B. S.; WILSON, W. P.; SLAUGHTER, D. G. Sensations Evoked by Stimulation in the Midbrain of Man. **Journal of Neurosurgery**, v. 30, n. 1, p. 14–24, jan. 1969.

OH, D. R. et al. Sedative and hypnotic effects of Vaccinium bracteatum Thunb. through the regulation of serotonergic and GABA A -ergic systems: Involvement of 5-HT 1A receptor agonistic activity. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 109, n. July 2018, p. 2218–2227, 2019.

PADOVAN, C. M.; GUIMARÃES, F. S. Restraint-induced hypoactivity in an elevated plus-maze. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 33, n. 1, p. 79–83, 2000.

PELLOW, S. et al. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure

- of anxiety in the rat. **Journal of neuroscience methods**, v. 14, n. 3, p. 149–67, 1985.
- PELLOW, S.; FILE, S. E. Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in an elevated plus-maze: a novel test of anxiety in the rat. **Pharmacology, biochemistry, and behavior**, v. 24, p. 525–529, 1986a.
- PELLOW, S.; FILE, S. E. Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in an elevated plus-maze: a novel test of anxiety in the rat. **Pharmacology, biochemistry, and behavior**, v. 24, n. 3, p. 525–529, 1986b.
- PIRES, G. N.; TUFIK, S.; ANDERSEN, M. L. Relationship between sleep deprivation and anxiety: experimental research perspective. **Einstein (São Paulo)**, v. 10, n. 4, p. 519–523, dez. 2012.
- POULTER, M. O. et al. GABAA Receptor Promoter Hypermethylation in Suicide Brain: Implications for the Involvement of Epigenetic Processes. **Biological Psychiatry**, v. 64, n. 8, p. 645–652, 2008.
- PRATT, A. J. The neuroanatomical basis of anxiety. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 55, n. 2, 1992.
- PRUT, L.; BELZUNG, C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: A review. **European Journal of Pharmacology**, v. 463, n. 1–3, p. 3–33, 2003.
- RAMOS, A. et al. A genetic and multifactorial analysis of anxiety-related behaviours in Lewis and SHR intercrosses. **Behavioural brain research**, v. 96, n. 1–2, p. 195–205, nov. 1998.
- RAMOS, A. Animal models of anxiety: do I need multiple tests? **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 29, n. 10, p. 493–498, 2008.
- RANKIN, C. H. et al. Habituation revisited: An updated and revised description of the behavioral characteristics of habituation. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 92, n. 2, p. 135–138, set. 2009.
- RAO, R. P. et al. Glucocorticoids Protect Against the Delayed Behavioral and Cellular Effects of Acute Stress on the Amygdala. **Biological Psychiatry**, v. 72, n. 6, p. 466–475, set. 2012.
- REIS, D. G. et al. Behavioral and autonomic responses to acute restraint stress are segregated within the lateral septal area of rats. **PLoS ONE**, v. 6, n. 8, 2011.
- RESLER, G. et al. Effect of folic acid combined with fluoxetine in patients with major depression on plasma homocysteine and vitamin B12, and serotonin levels in lymphocytes. **NeuroImmunoModulation**, v. 15, n. 3, p. 145–152, 2008.

- REYNOLDS, E. **Vitamin B12, folic acid, and the nervous system** *Lancet Neurology*, 2006.
- REYNOLDS, E. H. Benefits and risks of folic acid to the nervous system. **Journal of Neurology Neurosurgery and Psychiatry**, v. 72, n. 5, p. 567–571, 2002.
- RODRIGUES, G. M. et al. Acute stress affects the global DNA methylation profile in rat brain: Modulation by physical exercise. **Behavioural Brain Research**, v. 279, p. 123–128, 2015.
- SANDI, C. et al. Effects of chronic stress on contextual fear conditioning and the hippocampal expression of the neural cell adhesion molecule, its polysialylation, and L1. **Neuroscience**, v. 102, n. 2, p. 329–339, 2001.
- SANTOS, L. M. P. et al. Prevention of neural tube defects by the fortification of flour with folic acid: a population-based retrospective study in Brazil. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 94, n. 1, p. 22–29, 1 jan. 2016.
- SCAGLIONE, F.; PANZAVOLTA, G. Folate, folic acid and 5-methyltetrahydrofolate are not the same thing. **Xenobiotica**, v. 44, n. 5, p. 480–488, 4 maio 2014.
- SESTAKOVA, N. et al. Determination of motor activity and anxiety-related behaviour in rodents: Methodological aspects and role of nitric oxide. **Interdisciplinary Toxicology**, v. 6, n. 3, p. 126–135, 2013.
- SILVA, K.; CARVALHO, M. C.; PADOVAN, C. M. Tolerance to repeated stress in rats with lesions of the serotonergic neurons of the Median Raphe Nucleus and chronically treated with imipramine. **Behavioural Brain Research**, v. 302, p. 220–227, 2016.
- SMITH, A. D.; KIM, Y. I.; REFSUM, H. **Is folic acid good for everyone?** *American Journal of Clinical Nutrition*, 2008.
- TOFFOLI, L. V et al. Maternal exposure to fluoxetine during gestation and lactation affects the DNA methylation programming of rat's offspring: modulation by folic acid supplementation. **Behavioural brain research**, v. 265, p. 142–7, 15 maio 2014.
- TREIT, D. Animal models for the study of anti-anxiety agents: A review. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 9, p. 203–222, 1985.
- VIANA, M. B.; TOMAZ, C.; GRAEFF, F. G. The elevated T-maze: a new animal model of anxiety and memory. **Pharmacology, biochemistry, and behavior**, v. 49, n. 3, p. 549–54, nov. 1994.
- VIANA, M. DE B. Freud e Darwin: Ansiedade como sinal, uma resposta adaptativa ao perigo. **Natureza Humana**, v. 12, n. 1, p. 163–195, 2010.
- VIANNA, D. M. et al. Defensive freezing evoked by electrical stimulation of the periaqueductal

gray: comparison between dorsolateral and ventrolateral regions. **Neuroreport**, v. 12, n. 18, p. 4109–12, 21 dez. 2001.

VYAS, A. et al. Chronic stress induces contrasting patterns of dendritic remodeling in hippocampal and amygdaloid neurons. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 22, n. 15, p. 6810–6818, 2002.

VYAS, A.; CHATTARJI, S. Modulation of different states of anxiety-like behavior by chronic stress. **Behavioral neuroscience**, v. 118, n. 6, p. 1450–1454, 2004.

WILLIAMS, E. et al. Effect of folic acid supplementation on mood and serotonin response in healthy males. **British Journal of Nutrition**, v. 94, n. 04, p. 602, 2005.

WINKELS, R. M. et al. Bioavailability of food folates is 80% of that of folic acid. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 85, n. 2, p. 465–473, 1 fev. 2007.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Depression and Other Common Mental Disorders: Global Health Estimates**. [s.l: s.n.].

YU, M. et al. Folic acid stimulation of neural stem cell proliferation is associated with altered methylation profile of PI3K/Akt/CREB. **The Journal of nutritional biochemistry**, v. 25, n. 4, p. 496–502, abr. 2014.