



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

CHRISTIANE HENRIQUES FERREIRA

**EFEITOS FARMACOLÓGICOS DA QUERCETINA
SOBRE O COMPORTAMENTO DE *GROOMING*
INDUZIDO POR ESTRESSE E EM MARCADORES DE
ESTRESSE OXIDATIVO EM RATOS**

Londrina
2021

CHRISTIANE HENRIQUES FERREIRA

**EFEITOS FARMACOLÓGICOS DA QUERCETINA
SOBRE O COMPORTAMENTO DE *GROOMING*
INDUZIDO POR ESTRESSE E EM MARCADORES DE
ESTRESSE OXIDATIVO EM RATOS**

Dissertação apresentada à banca de defesa do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Londrina como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Celio Roberto Estanislau

Coorientadora: Dr^a. Camila Rodrigues Ferraz

Londrina
2021

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

F383 Ferreira, Christiane Henriques Ferreira.
Efeitos farmacológicos da quercetina sobre o comportamento de grooming induzido por estresse e em marcadores de estresse oxidativo em ratos / Christiane Henriques Ferreira Ferreira. - Londrina, 2021.
63 f.

Orientador: Celio Roberto Estanislau Estanislau.
Coorientador: Camila Rodrigues Ferraz Ferraz.
Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, 2021.
Inclui bibliografia.

1. Psicofarmacologia - Tese. 2. Quercetina - Tese. 3. Estresse oxidativo - Tese. 4. Grooming - Tese. I. Estanislau, Celio Roberto Estanislau. II. Ferraz, Camila Rodrigues Ferraz. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. IV. Título.

CDU 61

CHRISTIANE HENRIQUES FERREIRA

**EFEITOS FARMACOLÓGICOS DA QUERCETINA
SOBRE O COMPORTAMENTO DE *GROOMING*
INDUZIDO POR ESTRESSE E EM MARCADORES DE
ESTRESSE OXIDATIVO EM RATOS**

Dissertação apresentada à banca de defesa do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Londrina como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Celio Roberto Estanislau
Universidade Estadual de Londrina

Dra. Larissa Staurengo Ferrari
University of California, San Francisco

Prof. Dr. Guilherme Bracarense Filgueiras
Universidade Estadual de Londrina

Londrina, 15 de março de 2021

Agradecimentos

Em primeiro lugar, preciso agradecer aos meus pais, que sempre me proporcionaram condições para que eu fizesse não só uma, mas duas graduações e também um mestrado. Aqui vai o meu muito obrigada por tudo! Ser privilegiada nesse país, não é fácil, mas eu tive essa oportunidade e, espero poder retribuir socialmente com todo esse conhecimento. Então muito obrigada, pai, mãe, Gabriel e Lorena, por todo o apoio ao longo desse processo.

Também preciso agradecer aos meus colegas de laboratório, que passaram parte do mestrado comigo: Thiago Campoli e Andresa Bibiano. Vocês dois são as coisinhas mais fofas que eu conheço! Vocês foram fundamentais nesse processo de aprendizagem de métodos e também de apoio emocional, quando tudo parecia perdido.

Eduardo Vignoto, que, prontamente me ajudou e me ensinou alguns procedimentos, além de ter participado de parte dos meus experimentos e de todas as discussões sobre o projeto e também dos resultados. Muito obrigada!

Guilherme Filgueiras, que chegou depois, mas, desde o momento que chegou, sempre esteve pronto pra me ajudar, não só nos experimentos (em plena pandemia), mas também nas análises de dados e me aguentou, tirando minhas dúvidas por whatsapp, além de ter aceito ser minha banca. Muito obrigada!

Marinus Van Leewen, meu fiel IC, que também chegou depois, mas que me ajudou com referências, ficou pirando comigo em várias hipóteses e sempre foi muito parceiro! Muito obrigada!

Larissa Ferrari, que, além de ter aceito ser minha banca, teve muita paciência comigo no começo, me ensinando coisas que eram básicas, mas que eu não sabia, além de ter me ajudado a construir meu projeto e o delineamento. Eu tinha o maior receio de quem me ajudaria, mas você sempre foi reforçadora! Muito obrigada!

Ana Carolina Massaro e Michele Brizzi, minhas ex companheiras de clínica, que sempre alegraram os meus dias enquanto eu estava lá! Obrigada por terem aturado as minhas crises quando eu não sabia mais o que fazer!

Bruno Sanches, Daniele Elizabeth e Fernanda Massi, o meu trio preferido! Mesmo longe, sempre estiveram perto e foram muito presentes nesse processo de mestrado! Muito obrigada por todas as conversas, todas as risadas e todo apoio! Eu amo vocês!

Natalia Bittencourt e Joyce Siqueira, as minhas amigas de infância, que estão há 1000 km de distância, mas que nunca deixaram de ser presentes, por mais chato que isso pudesse ser (sim, eu sou ansiosa e infernizei todo mundo com essa dissertação)! Vocês foram uma segurança, quando eu não tinha! Por todas as conversas, por todas as broncas, por todos os devaneios, muito obrigada! A presença de vocês foi fundamental!

Viviane Mestre e Gabriela Silva, minhas colegas de turma, companheiras de seminários, que viraram amigas pra vida! Vocês fizeram as aulas serem mais leves! Obrigada por todos os cafés no HU, obrigada por dividirem angústias e inseguranças comigo! Vocês foram muito importantes!

Katia Naveiros, um dos presentinhos mais lindos que chegou bem no final do mestrado, mas que não foi menos importante por isso. Obrigada por me ouvir falando e falando dos meus ratos e por tentar entender o que eu falava. Obrigada por ter sido tão linda quando eu estava tão perdida! Só obrigada!

Thais e Thiago Monteiro e Rosana Leite, meus primeiros amores de Londrina e que sempre estiveram presentes, durante todos os processos! Eu não sei nem o que dizer pra vocês, porquê nada seria suficiente pra descrever a importância que vocês têm na minha vida. Obrigada por todos os vinhos, por todos os sermões, por todas as conversas... Por tudo! Eu amo tanto vocês que não sei nem descrever! Obrigada!

Eddy Krueger, que, pacientemente, foi meu supervisor de estágio em docência por mais de um ano. Que me ensinou boa parte do que eu sei sobre neurociências e fez eu me apaixonar ainda mais pela área. Me ensinou sobre neuroanatomia, sobre neurofisiologia e muitas outras “neuro” coisas. Muito obrigada por ter me ensinado tanto! Obrigada pela paciência e por ser sempre tão solícito! Obrigada por sentar comigo e abrir um atlas de anatomia de roedores e tentar tirar as minhas dúvidas! Obrigada!

Amanda Moraes, que chegou depois, mas fez uma diferença enorme! Obrigada por todos os devaneios, por compartilhar ideologias e cerveja comigo! Eu aprendo diariamente com você! Obrigada por interpretar Ana Carolina comigo, por compartilhar conversas tão sem sentido para os outros, mas tão funcionais para nós! Você foi fundamental nessa reta final! Simplesmente, obrigada!

Thainã Eloá e Leandro Fazzano, doces presentes que o CRP/PGAC me deram! Os meus intervalos entre um experimento e outro eram muito mais legais tendo vocês como companhia! Obrigada por todas discussões políticas, em meio aos meus experimentos! Obrigada por tudo!

Paula Vicente e Rafael Coli, que também chegaram depois, mas nem por isso foram menos importantes. Obrigada por todas as cervejas e todas as discussões políticas!

Natalia Ferrer, minha psicóloga, que permitiu que eu tivesse sanidade mental pra passar pela pós-graduação. Só vou dizer isso mesmo, porquê nada vai descrever o que eu sinto. Obrigada!

Mayara Cavalheiro, que chegou no final, mas chegou na hora certa. Minha companheira de clínica e de vida! A que não entendia quase nada do que eu falava da minha dissertação, mas estava sempre lá pra ouvir. A que aguentou as minhas crises de ansiedade (que não foram poucas) e estava sempre lá! A que me dava cerveja pra me acalmar. Aquela que sempre me fazia acreditar que a coisa ia melhorar! Aquela que me incentivava, sempre! Eu só consigo te

agradecer mesmo, por tudo. Por existir, por ser tão linda, por ser tão você! Ah, vamos agradecer ao Lucas Dalla também! Veio de brinde, mas não deixou de ser importante! Obrigada, por tudo!

Camila Ferraz. Chegamos na Camila, que foi uma das pessoas mais incríveis que eu conheci no mestrado. Sabe aquela coisa, de que se nada der certo, eu conheci fulano? Então, eu conheci a Camila. A gente deu match de cara e eu nem sei muito bem explicar por quê. Na verdade, eu sei: política. A gente tem a mesma visão política e a gente virou parça por isso. A gente passou a dividir várias coisas, inclusive a mesma terapeuta e até alguns amigos. A gente dividiu alguns ódios e amores. Era com ela que eu falava quando eu queria devanear sobre a vida ou pra mandar meme. Mas estava tudo bem, porquê a Camila era uma daquelas pessoas que chegam feito um furacão na nossa vida, sabe? Ela é uma enfermeira bioquímica e, assim como a Lari, teve muita paciência pra me ensinar estresse oxidativo. Confesso, nossas aulas foram a base de cerveja, mas eu (acho que) aprendi. Ela me ensinou tanto, mas tanto, que não caberia descrever aqui. Virou uma parceira da vida mesmo. Aqui vai o meu muito obrigada por existir, por ter tido paciência comigo, por ter sido tão legal! Talvez você nem saiba, mas você foi um reforçador em muitos momentos desse mestrado! As suas explicações pareciam fazer a coisa ser fácil... e no meio delas, sempre vinham outros assuntos, o que fazia a coisa ficar leve! A minha jornada sem você não teria sido a mesma! Eu compartilhei com você muito mais que um mestrado; eu compartilhei a vida com você e sou muito feliz por você ter voltado da Austrália na hora certa! Você conheceu as minhas piores versões e ainda assim, escolheu ficar! Muito obrigada!

Por fim, Celio Estanislau. O melhor orientador que eu poderia ter! Me orientou, me acolheu, me ensinou e eu só posso agradecer mesmo. Obrigada por toda paciência em me explicar estatística (que foi mais de uma vez, teve que repetir a mesma coisa mais de uma vez, eu sei, rs), obrigada por todo apoio durante esse processo, obrigada por achar que eu podia, mesmo quando eu achava que a única alternativa era sair correndo. Obrigada por toda paciência de responder dúvidas óbvias por mensagem. Espero não ter te decepcionado! Obrigada pela parceria!

À Capes, pelo apoio financeiro.

FERREIRA, Christiane Henriques. **Efeitos farmacológicos da quercetina sobre o comportamento de *grooming* induzido por estresse e em marcadores de estresse oxidativo em ratos.** 2021. 61 f. Dissertação (Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2021

RESUMO

A quercetina (QUER) é um potente flavonoide antioxidante cujos efeitos relacionados ao comportamento ainda são pouco conhecidos. O *grooming* é um comportamento repetitivo e estereotipado de autocuidado em roedores, que é intensificado na presença de um estressor. O estresse de contenção causa alterações tanto no *grooming* quanto no estresse oxidativo em nível sistêmico. Neste estudo, os efeitos da quercetina sobre o *grooming* induzido por estresse de contenção foi avaliado, bem como sobre marcadores de estresse oxidativo. 41 ratos machos receberam uma administração oral de veículo ou QUER (300 mg/kg). Depois de 120 minutos, o grupo submetido ao estresse, ficou por 120 minutos contido dentro de um cone de arame, enquanto o grupo não submetido ao estresse permanecia em uma sala separada. Ao final desse período, os animais foram colocados em uma caixa de acrílico, onde ficaram por 10 minutos e as medidas de *grooming* e locomoção foram avaliadas. Na sequência, os animais foram submetidos ao teste *Marble Burying* e, imediatamente após, foram anestesiados e uma amostra de sangue total foi colhida. Dessa forma, houve quatro grupos: veículo sem contenção, veículo+contenção, tratamento sem contenção e tratamento+contenção. São apresentados resultados de análise de variância de duas vias seguida por teste de *Tukey*. A interação entre QUER e estresse levou a redução da locomoção, efeito mais visível na comparação entre os dois grupos estressados. O *grooming* dirigido à superfície corporal foi aumentado nos animais submetidos ao tratamento e à contenção. QUER, quando combinada ao estresse, levou a um aumento no componente rostral e na duração total do *grooming*. As análises bioquímicas apontaram que o estresse de contenção aumentou o estresse oxidativo e a QUER reverteu esse efeito. Os resultados com a QUER confirmam seu potencial antioxidante e anti-inflamatório, além de sugerir um potencial terapêutico para doenças relacionadas ao estresse, uma vez que a QUER diminuiu o processo inflamatório induzido pelo estresse e foi capaz de alterar a resposta comportamental a ele.

Palavras-chave: quercetina; *grooming*; estresse de contenção; estresse oxidativo.

FERREIRA, Christiane Henriques. **Pharmacological effects of quercetin on stress-induced grooming behavior and oxidative stress markers in rats.** 2021. 61 p. Dissertation (Master Degree in Health Science) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2021.

ABSTRACT

Quercetin (QUER) is a potent antioxidant flavonoid that can have some behavioral effects, which are poorly known. Grooming is a repetitive and stereotyped self-caring behavior of rodents, which is intensified in the presence of a stressor. This behavior can be compared to obsessive-compulsive disorder (OCD), which also has repetitive patterns. Restraint stress causes changes in both grooming and oxidative stress at the systemic level. In this study, the effects of quercetin on restraint stress-induced grooming were evaluated, as well as the effects of QUER on oxidative stress markers. 41 rats received an oral administration of vehicle or QUER (300 mg / kg). After 120 minutes, the group submitted to stress was restrained for 120 minutes in a wire cone, while the group that was not submitted to stress remained in another room. At the end of this period, the animals were placed in an acrylic box, where they stayed for 10 minutes and grooming and locomotion measures were evaluated. Afterwards, the animals were submitted to the Marble Burying test and, immediately after, they were anesthetized and a blood sample was collected. Thus, there were four groups: vehicle without restraint, vehicle + restraint, treatment without restraint and treatment + restraint. Results of two-way analysis of variance followed by Tukey test are presented. The interaction between QUER and stress led to low locomotion, a more visible effect in the comparison between the two stressed groups. Grooming directed to the body surface was increased in animals submitted to treatment and restraint. QUER, when combined with stress, led to an increase in the rostral component and the total duration of grooming. Biochemical analyses showed that restraint stress increased oxidative stress and QUER reversed this effect. The results with QUER confirm its antioxidant and anti-inflammatory potential, in addition to suggesting a therapeutic potential for stress-related diseases, since QUER has reduced the inflammatory process induced by stress and could alter the behavioral response to it.

Keywords: quercetin; grooming; restraint stress; oxidative stress.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1^a	Grupos experimentais	25
Figura 1B	Delineamento experimental	25
Figura 2	Frequência de locomoção	39
Figura 3	Duração de grooming rostral	40
Figura 4	Duração de grooming corporal.....	41
Figura 5	Duração total de grooming	42
Figura 6	Frequência de cadeias estereotipadas.....	43
Figura 7	Teste Marble Burying	44
Figura 8	Ensaio FRAP.....	45
Figura 9	Ensaio ABTS.....	46
Figura 10	Ensaio TBARS	47

LISTA DE SIGLAS

5HT	serotonina
ACTH	hormônio adrenocorticotrópico
ATP	adenosina trifosfato
CAT	catalase
CORT	corticosterona
CRF	hormônio liberador da corticotrofina
ELA	esclerose lateral amiotrófica
ENO	espécies reativas de nitrogênio
ERO	espécies reativas de oxigênio
GABA	ácido gama-aminobutírico
GPx	glutathione peroxidase
HPA	hipotálamo-pituitária-adrenal
IFN	interferon
IL-1 β	interleucina 1-beta
IL-6	interleucina 6
ISRS	inibidor seletivo da recaptação de serotonina
MDA	malondialdeído
NA	noradrenalina
PGAC	Psicologia Geral e Análise do Comportamento
QUER	quercetina
SAG	síndrome da adaptação geral
SNA	sistema nervoso autônomo
SNAp	sistema nervoso autônomo parassimpático
SNAs	sistema nervoso autônomo simpático
SNC	sistema nervoso central
SOD	superóxido dismutase
TNF- α	fator de necrose tumoral-alfa
TOC	transtorno obsessivo-compulsivo
WIR	water immersion restraint

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	OBJETIVOS GERAL E ESPECÍFICOS	20
2.1	OBJETIVO GERAL	20
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
3	MATERIAIS E MÉTODOS	21
3.1	ANIMAIS.....	21
3.2	DROGA.....	21
3.3	PROTOCOLO EXPERIMENTAL	21
3.4	TESTES COMPORTAMENTAIS	22
3.4.1	Aparato Da Caixa De Acrílico	22
3.4.2	Teste Marble Burying.....	23
3.5	AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO	23
3.5.1	Ensaio Abts E Frap	24
3.5.2	Estimativa Da Peroxidação Lipídica Pela Formação De Malondialdeído (Mda)	24
3.6	ANÁLISES DE DADOS.....	24
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
4.1	FLAVONOIDE QUERCETINA SIMULTANEAMENTE REGULA O ESTRESSE OXIDATIVO E INTENSIFICA O <i>GROOMING</i> INDUZIDO POR ESTRESSE DE CONTENÇÃO EM RATOS	26
5	CONCLUSÃO	55
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56

1 INTRODUÇÃO

O estresse está envolvido na etiologia de inúmeras doenças, dentre elas os transtornos mentais, e tem se tornado um desafio para a saúde pública (Everly e Lating, 2013). Um estudo da *Global Burden of Disease Study* revelou que transtornos psiquiátricos representam um contribuinte significativo para o aumento da doença global em países de baixa, média e alta renda (Whiteford et al., 2013). Dessa forma, estudar sobre o estresse é importante para melhorar o entendimento tanto da etiologia, quanto sua relação com o agravamento dos sintomas de doenças a ele relacionadas.

O termo 'estresse' pode ser de forma geral definido como uma perturbação real ou antecipada da homeostase ou uma antecipação de uma ameaça ao bem estar (Ulrich-Lai e Herman, 2009). As respostas de estresse tem como função o reestabelecimento do equilíbrio do organismo (Ulrich-Lai e Herman, 2009). Uma das alterações que caracterizam a resposta de estresse é a liberação do hormônio adrenocorticotrópico (ACTH) e corticoides na corrente sanguínea e a ativação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) (Graeff, 2007). Dessa forma, tanto o conceito de homeostase quanto o conceito de resposta ao estresse se referem a compreensão do mecanismo de regulação e ajuste do organismo frente a desafios (Souza et al., 2015).

O estresse ativa a divisão simpática do Sistema Nervoso Autônomo (SNAs), como parte da reação de luta ou fuga. Em seguida, há a ativação da divisão parassimpática do Sistema Nervoso Autônomo (SNAp) com a finalidade de fazer o indivíduo voltar a sua homeostase. Na ativação do SNAs, há a liberação de noradrenalina (NA) pelas fibras nervosas simpáticas periféricas em diferentes tecidos, assim como a liberação de adrenalina da medula adrenal na corrente sanguínea (Graeff, 2007). Dessa forma, o SNAs é o responsável pela resposta mais imediata ao estressor.

Hans Selye foi o primeiro pesquisador a utilizar o termo estresse, que originalmente foi definido como uma resposta não específica do corpo a qualquer estímulo nocivo (Filgueiras and Hippert, 1999; Koolhaas et al., 2011; Sousa et al., 2015). No entanto, décadas depois o conceito foi reformulado, para, dentre outras razões, que fosse possível distinguir resposta ao estresse e estressor (Koolhaas et al., 2011). Dessa forma, um estressor é um estímulo que ameaça a homeostase e o estresse é a reação do organismo com a finalidade de recuperar a homeostase (Koolhaas et al., 2011).

Em sua versão inicial, Selye chamou atenção para o aspecto adaptativo do estresse, formulando a teoria da Síndrome da Adaptação Geral (SAG) (Koolhaas et al., 2011). Após uma exposição prolongada a estressores, o aspecto adaptativo falha, fazendo com que o organismo atinja uma fase de exaustão com efeitos adversos e inúmeras consequências, resultando em uma má adaptação ao estresse (Koolhaas et al., 2011).

Na teoria da SAG, Selye aponta três fases distintas. A primeira fase, a de alarme ou alerta, caracteriza-se por manifestações agudas, nas quais o corpo reconhece o agente estressor, ativando o SNA (Souza et al., 2015; Filgueiras e Hippert, 1999), o qual vai promover a liberação de alguns neurotransmissores em órgãos-alvo, estimulando também a liberação de hormônios catecolaminérgicos, adrenalina e noradrenalina, pela medula das glândulas adrenais; adicionalmente o eixo HPA é ativado (Souza et al., 2015). Nessa fase, o organismo se prepara para responder ao perigo e essa resposta pode ser uma resposta de luta ou fuga.

A segunda fase é a de resistência, na qual, para restabelecer a homeostase, as respostas comportamentais e fisiológicas são mantidas. Tais respostas são mediadas principalmente pelo cortisol, que é liberado pelo córtex das glândulas adrenais, em resposta a ativação do eixo HPA. Todas essas respostas são para que o indivíduo consiga neutralizar o agente estressor (Souza et al., 2015)

A terceira fase é a da exaustão, que ocorre caso o indivíduo não consiga neutralizar o agente agressor. Dessa forma, ele continua respondendo de forma crônica e aquelas respostas que inicialmente eram consideradas adaptativas, agora viram uma sobrecarga energética e levam a exaustão do organismo (Souza et al., 2015). O próprio Selye ressalta que a maioria das manifestações características da primeira fase desaparecem ou são revertidas durante a segunda fase, no entanto, reaparecem na terceira fase. (Selye, 1952).

Koolhaas et al. (2011) criticaram o uso do termo estresse se referindo a condições que vão desde uma estimulação desafiadora mais branda, até condições muito aversivas, pois, segundo os autores, a revisão de literatura mostra que as respostas fisiológicas de estresse a estímulos recompensadores, que podem não ser considerados estressores, podem ser tão grandes quanto a resposta a estímulos negativos. Os autores apoiam o argumento de que a análise da resposta fisiológica durante o exercício corrobora com a visão de que a magnitude da resposta neuroendócrina corresponde às demandas metabólicas e fisiológicas necessárias para atividade comportamental. Dessa forma, os autores propõem que o termo estresse seja utilizado de forma restrita às condições em que uma demanda ambiental excede a capacidade regulatória natural de um organismo, em situações que incluem imprevisibilidade e incontabilidade. Essa definição baseia-se na evidência de que o estresse, em nível fisiológico, parece ser caracterizado por uma reação neuroendócrina marcada pela ausência de uma resposta antecipada (imprevisibilidade) e/ou por uma recuperação reduzida (incontabilidade). O uso desses termos enfatiza a importância de considerar os aspectos cognitivos e perceptivos de estresse, além de respostas comportamentais e fisiológicas (Koolhaas et al., 2011).

Em nível fisiológico, a amígdala, ao reconhecer um estímulo como aversivo, ativa vias que a ligam ao hipotálamo, as quais executam alterações neurovegetativas e hormonais, que são características diante de desafios em geral. A primeira via é originada no hipotálamo lateral, que ativa o SNAs, resultando na liberação de NA. Além disso, a adrenalina é secretada pela medula da adrenal na circulação sanguínea. Juntos, os dois neurotransmissores/hormônios são responsáveis pela promoção da maior parte das alterações que caracterizam a “reação de emergência”, definida inicialmente por Cannon. As alterações neurovegetativas podem ser taquicardia, hipertensão arterial, vasodilatação e vasoconstrição. A redistribuição do oxigênio contido na hemoglobina é responsável pela sustentação da reação de luta ou fuga (Graeff, 2014).

A segunda via da resposta de estresse tem como referência o eixo HPA. No núcleo paraventricular do hipotálamo, há células neuroendócrinas sintetizadoras do hormônio liberador de corticotrofina (CRH), que é liberado por essas células e chega na pituitária pelo sistema porta-hipofisário. Nesse ponto, há o estímulo de células que fazem a síntese e armazenamento do ACTH, promovendo a secreção desse hormônio na corrente sanguínea. Ao chegar nas glândulas adrenais, o ACTH realiza a estimulação da secreção de hormônios corticoides, que, entre outras atividades, elevam o nível de glicose no sangue, que pode ser usada em situações de emergência (Graeff, 2014).

Há evidências que indicam que o estresse desempenha um papel na etiologia ou no agravamento de diversos transtornos (APA, 2013). Dessa forma, a incorporação desse fator em um procedimento de modelo animal de transtorno pode contribuir para sua validade. Os modelos animais possibilitam investigar experimentalmente alguns aspectos etiológicos e eventuais formas de tratamento de determinados transtornos. Esses modelos são também importantes para um melhor entendimento das bases biológicas e farmacológicas envolvidas nesses transtornos (Fernandez et al., 2006). Um comportamento observado em roedores que é claramente afetado por estresse é a auto-limpeza.

O comportamento de limpeza (*grooming*) é uma atividade muito comum no comportamento de ratos e com várias possibilidades de uso em modelos animais (Kalueff et al., 2016). É um comportamento inato, envolvido com a manutenção da higiene e outros processos, como termorregulação, comunicação social e redução da excitação (*dearousal*) (Estanislau et al., 2019; Estanislau et al. 2013; Spruijt et al., 1992). Cada espécie tem suas próprias características no padrão de apresentação do comportamento de *grooming* (Spruijt et al., 1992).

O *grooming* é um importante fenótipo comportamental que pode ser usado para entender a base neural de um padrão de ações complexas de animais, incluindo

humanos, em condições normais e anormais. Segundo Kalueff et al. (2016), o *grooming* pode ser relevante para o estudo da neurobiologia de comportamentos complexos, repetitivos e com padrões sequenciais (Kalueff et al., 2016).

Embora tenha uma função de limpeza, a ocorrência de *grooming* é frequentemente melhor explicada pelo contexto no qual ocorre do que pelo estado da pele ou da pelagem. Mais especificamente, o *grooming* pode ser exacerbado durante (e após) a exposição a diferentes tipos de estressores (Spruijt et al., 1992). Em roedores, é observado na forma de uma sequência de movimentos, geralmente dirigidos às partes do corpo com um padrão cefalocaudal progressivo, começando pela cabeça, seguindo para o corpo e por fim para as regiões genitais e cauda (Kalueff et al., 2016). Essa sequência pode ser afetada por manipulações experimentais, como lesões de vias dopaminérgicas no trato nigroestriatal, administração de drogas dopaminérgicas, mutação genética ou estresse psicológico (Kalueff et al., 2016).

A complexidade do comportamento de *grooming* pode ser ressaltada ao se analisar suas bases neurobiológicas. Em síntese (para uma explicação mais pormenorizada, ver Kalueff et al., 2016), os núcleos da base, especialmente o estriado e suas entradas dopaminérgicas controlam o *grooming* em sua sequência. O neocórtex está envolvido na modulação geral dos movimentos do *grooming*, enviando projeções excitatórias para o estriado e recebendo projeções excitatórias do tálamo e amígdala, que está envolvida num contexto específico de modulação. Já o hipotálamo é importante para a regulação neuroendócrina do *grooming*, como estimulação do núcleo paraventricular. O eixo HPA também modula o *grooming*, vários hormônios, especialmente CRH e ACTH, induzem o *grooming*. Os efeitos desses hormônios são parcialmente dependentes do sistema dopaminérgico mesolímbico.

Assim como no *grooming*, os núcleos da base também estão envolvidos na coordenação de movimentos (controle do início, modulação e planejamento de sua sequência) em humanos (Cordioli, 2014), que podem apresentar um comportamento de limpeza exacerbado em transtornos ritualísticos, como o TOC (Graybiel e Saka, 2002). Humanos apresentam esse padrão durante situações estressantes, as quais aumentam a severidade do comportamento (Kalueff et al., 2016; Berridge e Whishaw, 1992).

Segundo Spruijt et al. (1992), o *grooming* pode ser modulado por diferentes contextos, sendo que um deles é a exposição a situações estressoras. Segundo Buynitsky e Mostofsky (2009), a contenção e a imobilização estão entre os métodos mais utilizados para induzir estresse em roedores e isso ocorre porque esses procedimentos são baratos, indolores e possuem uma execução fácil, além de não causar debilitação duradoura no animal. O estresse por contenção é considerado psicogênico, pois não envolve dor ou qualquer lesão tecidual.

Além de afetar o comportamento e diversos parâmetros fisiológicos, vale notar que o estresse de contenção é capaz de induzir neuroinflamação (Munhoz et al., 2008; Zhang et al., 2019) e de alterar marcadores de estresse oxidativo (Buynitsky e Mostofsky, 2009)-

O termo neuroinflamação (isto é, inflamação que ocorre no sistema nervoso central) compreende uma série de eventos destinados a lidar com ameaças possíveis ou reais para o encéfalo. Os principais atores nesse cenário são as células da glia (Refolo e Stefanova, 2019). Após a ativação, essas células se envolvem na produção de citocinas inflamatórias, que mantêm e potencializam o quadro inflamatório. A neuroinflamação é reconhecida como o principal componente patológico de praticamente todas as doenças neurodegenerativas e também tem sido um foco de pesquisa sobre estresse (Crowley et al., 2016). Evidências crescentes apoiam que o estresse induz neuroinflamação, que modula bidirecionalmente o neurotransmissor GABA (Crowley et al., 2016).

Há evidências de que no estresse, o processo de neuroinflamação ocorre em paralelo com alterações comportamentais. Foi observado que ratos tratados com minociclina, um antagonista de micrógliã, apresentam diminuição de comportamentos de *grooming* induzidos por estresse crônico ultramoderado e tal efeito é acompanhado por redução da neuroinflamação e dos níveis de GABA do hipocampo (Zhang et al., 2019). O NFκB é uma via de transcrição importante para neuroinflamação, uma vez que orchestra a transcrição de vários genes inflamatórios, incluindo TNF-α e IL-1β (Shih et al., 2015). Em um ciclo de feedback, essas citocinas também têm a capacidade de desencadear a ativação clássica de NFκB (Shih et al., 2015). Dessa forma, considerando que a ativação da microglia envolve a sinalização intracelular via NFκB (Popiolek-Barczyk e Mika, 2016), isso indica que a neuroinflamação induzida por estresse ocorre por meio da liberação de mediadores inflamatórios, como TNF-α e IL-1β das células gliais ativadas.

Conforme já citado acima, o estresse de contenção também altera parâmetros oxidativos (Buynitsky e Mostofsky, 2009). O estresse oxidativo pode ser definido como um desequilíbrio entre a remoção e a formação de radicais livres no organismo, gerando um estado pró-oxidante (Braz, 2015). Ele ocorre quando há uma produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (EROs) e de nitrogênio (ENOs) (Rahal et al., 2014). As EROs são geradas como subproduto de produtos de metabolismo aeróbico normal e seu nível aumenta sob estresse (Rahal et al., 2014). Esse processo gera oxidação de biomoléculas, o que, quando cronificado, acarreta na perda de suas funções biológicas e processos inflamatórios (Barbosa et al., 2010).

Os radicais livres são moléculas extremamente reativas com um ou mais elétrons não-pareados. Eles possuem meia vida muito curta, são altamente instáveis devido sua configuração e se ligam de forma rápida a moléculas vizinhas (Prado, 2012). Os radicais livres em excesso possuem um papel importante na lesão tecidual e envelhecimento celular (Prado, 2012). Os radicais livres atuam como mediadores para transferência de elétrons em diferentes reações bioquímicas durante os processos metabólicos. A produção adequada desses radicais livres é importante para a geração de trifosfato de adenosina (ATP), participação no mecanismo de defesa durante o processo de infecção, entre outras atividades (Barbosa et al., 2010)

Os radicais livres são co-fatores para o desenvolvimento de doenças como hipertensão, doenças vasculares, síndromes metabólicas e transtornos mentais (David et al., 2016). Sua produção constitui um processo contínuo e fisiológico para cumprir funções biológicas relevantes (Barbosa et al., 2010). Qualquer alteração na homeostase leva a um aumento da produção desses radicais livres (Rahal et al., 2014).

Para combater o dano causado pelo estresse oxidativo, os organismos possuem sistemas de defesa antioxidante, que têm como finalidade realizar a limitação dos níveis intracelulares das EROs e ENOs e controlar os danos recorrentes desse processo (Barbosa et al., 2010). Dessa forma, o sistema de defesa antioxidante tem como função inibir e/ou reduzir os danos causados pela ação deletéria tanto dos radicais livres, quanto das espécies não-reativas.

Considera-se antioxidante qualquer substância que, estando presente em menor concentração do que as do substrato oxidável, é capaz de inibir ou atrasar a oxidação dele de forma eficaz (Barbosa et al., 2010). Os antioxidantes podem ser enzimáticos ou não-enzimáticos. No primeiro caso, estão inclusas as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutatona peroxidase (GPx). De maneira geral, a ação dessas enzimas é feita por meio de mecanismos de prevenção, que impedem e/ou controlam a formação de radicais livres e espécies não-reativas. Essas enzimas estão envolvidas com a iniciação de reações em cadeia que levam a propagação e amplificação do processo e a ocorrência de estresse oxidativo (Barbosa et al., 2010). Já os antioxidantes não-enzimáticos são os de origem dietética, como vitaminas, minerais e compostos fenólicos. Tanto o ácido ascórbico (vitamina C), quanto o α -tocoferol (vitamina E) e β -caroteno (vitamina A) são antioxidantes não-enzimáticos. Além deles, há ainda os antioxidantes não-enzimáticos endógenos, como a glutatona reduzida, ácido úrico e a melatonina (Barbosa et al., 2010). Essas moléculas atuam através do sequestro ou inativação das EROs, neutralizando o poder lesivo dessas biomoléculas e isso ocorre através de três mecanismos de ação básicos: 1) atividade sequestradora; 2) atividade estabilizadora e 3) atividade quelante de metais (Prado, 2012).

O SNC é particularmente sensível ao estresse oxidativo, pois conta com baixos níveis de antioxidantes se comparado a outros tecidos, requer grande necessidade de oxigênio para suas reações e possui uma grande quantidade de ácidos graxos poli-insaturados (Braz, 2015; Salim, 2017; Silva, 2012). Com efeito, o estresse oxidativo está envolvido em várias doenças neurodegenerativas, como Alzheimer e em outras doenças relacionadas ao SNC como acidente vascular encefálico (David et al, 2016) e em transtornos psiquiátricos, como depressão e ansiedade (Salim, 2014) e TOC (Behl et al., 2010; Shrivastava et al., 2017).

As discussões acerca da fisiopatologia de transtornos como TOC, depressão e ansiedade, concentram-se em explicações relativas a anormalidades nos neurotransmissores GABA e 5HT. No entanto, as explicações referentes ao estresse oxidativo também são importantes, principalmente porque o estresse psicológico resulta na produção de EROs, especialmente no cérebro. Dessa forma, quando a produção de EROs ultrapassa a capacidade antioxidante, em geral, a peroxidação lipídica ocorre (Salim, 2014).

Estudos têm sugerido uma relação entre alguns tipos de transtornos relacionados à ansiedade, como transtorno obsessivo-compulsivo (TOC) e pânico, ao estresse oxidativo (Salim, 2014). Tais pesquisas demonstram que o metabolismo oxidativo pode afetar na regulação da ansiedade, depressão e esquizofrenia (Salim, 2014). Modelos animais têm sido úteis para clarear o papel do estresse oxidativo nos comportamentos tipo-ansiosos em roedores. Há pesquisas demonstrando um papel causal do estresse oxidativo nos comportamentos tipo-ansiosos e que o tratamento com antioxidantes pareceu prevenir a ansiedade induzida por essas drogas (Salim, 2014).

Noções relativas a estresse oxidativo têm se mostrado importante para a compreensão do TOC. Behl et al., (2010) defendem que sua relação com o estresse oxidativo está nos núcleos da base. Outros estudos relacionam o aumento de estresse oxidativo com o comportamento tipo obsessivo-compulsivo em roedores. Esses estudos demonstram que um dos meios pelos quais os inibidores seletivos da recaptação de serotonina contribuem para controlar o comportamento tipo obsessivo-compulsivo é através do aumento dos níveis de óxido nítrico no cérebro (Kar e Choudhury, 2016) Um estudo com uma linhagem específica de camundongos (*deer mouse*), que apresenta comportamentos estereotipados espontâneos, analisou a relação desse comportamento com marcadores de estresse oxidativo e demonstrou que uma deficiência do sistema de glutathiona no córtex pré-frontal é responsável pelo aumento desse comportamento nos animais (Güldenpfennig et al., 2011).

Também há evidências da relação entre TOC e estresse oxidativo em humanos. Em um estudo realizado com pacientes diagnosticados com TOC, uma amostra de

plasma foi retirada três semanas após uma dieta com vitamina C e E. Os resultados demonstraram que os pacientes possuíam níveis de MDA mais altos do que o grupo controle, indicando que os danos causados pelos radicais livres podem estar relacionados a tal transtorno e que terapia cujo alvo seja a produção de MDA poderia ter um efeito benéfico no TOC (Behl et al., 2010). Um estudo observacional avaliou níveis de SOD, CAT, GPx, MDA e cortisol em pacientes com TOC, cujos sintomas eram observados por pelo menos um ano e que não estivessem medicados. Assim como no estudo anterior, foram observados níveis altos de MDA e níveis baixos de CAT, SOD e GPx. Esse resultado também reforça que o estresse oxidativo está envolvido da fisiopatologia do TOC (Behl et al., 2010).

Uma molécula antioxidante importante não enzimática são os flavonoides, que são um grupo essencial dos compostos polifenólicos. Eles são amplamente encontrados em vegetais, frutas e em algumas bebidas. Já há mais de 3000 variedades de flavonoides reportados e o interesse nessa classe é devido a seu potencial antioxidante, analgésico e anti-inflamatório (David et al., 2016; Ferraz et al., 2020).

Os flavonoides podem ser divididos em seis classes, de acordo com sua estrutura: flavononóis (quercetina), flavonas (apigenina), flavanona (narigenina) (Ferraz et al., 2020), flavanóis, isoflavone e *anthocyanidins* (David et al., 2016). Eles previnem o dano causado pelo estresse oxidativo por meio da ativação de enzimas antioxidantes, quelação de metais, redução dos radicais α -tocoferil, inibição de oxidases e a mitigação do estresse oxidativo causado pelo óxido nítrico (David et al., 2016).

Um importante flavonoide é a quercetina (3,3',4',5,7 – pentahydroxyflavone), que é encontrada em diferentes frutas e vegetais, como na beterraba, maçã, tomate, cebola (Ferraz et al., 2020), vinho tinto, chá preto e cerveja (Behling et al., 2004). A quercetina é o flavonoide mais abundante na dieta humana, além de estar presente em mais de 20 plantas. A quercetina é conhecida pelas suas atividades anti-inflamatórias, anti-hipertensivas, antioxidantes, efeitos vasodilatadores, entre outros (David et al., 2016).

Um dos principais efeitos biológicos da quercetina é a inibição do processo de formação de radicais livres por meio do sequestro de radicais de oxigênio, além de atividade de quelação de ferro (Behling et al., 2004). A quercetina também possui alguns efeitos clínicos, como a proteção contra osteoporose, câncer de pulmão e doenças cardiovasculares, além de apresentar ação anti-inflamatória.

A quercetina apresenta efeitos biológicos protetores em doenças neurodegenerativas, como Alzheimer e Parkinson, que estão associadas a processos de neuroinflamação no SNC (David et al., 2016). Ela reduz a incidência de dano oxidativo nos linfócitos e em estruturas neurovasculares e inibe danos aos neurônios, além de proteger células contra o estresse oxidativo (David et al., 2016).

Assim, o efeito anti-inflamatório da quercetina está relacionado à inibição da ativação do NFκB e por ativar a via de sinalização antioxidante Nrf2/HO-1 (Guazelli et al., 2013). Além disso, o estresse oxidativo causa ativação adicional de NFκB e superprodução de citocinas inflamatórias. A ativação do sistema Nrf2/ARE desempenha um papel importante na interrupção deste ciclo (Ahmed et al., 2017). O NFκB compete com o Nrf2 pela proteína de ligação CREB (Liu et al., 2008). Portanto, a capacidade da quercetina em ativar a sinalização antioxidante Nrf2/HO-1 é uma característica importante de seu mecanismo anti-inflamatório.

Kawabata et al. (2010) demonstraram que a quercetina suprime o aumento dos níveis de hormônios de estresse, incluindo corticosterona (CORT) e ACTH no plasma de ratos. Considerando que o eixo HPA é uma cascata hormonal composta em suas etapas iniciais pela secreção do hormônio liberador de corticotrofina (CRH), sua supressão pela quercetina pode ser essencial para atenuação da ativação do eixo HPA. Embora esse mecanismo ainda não esteja totalmente elucidado, a quercetina pode ser útil na prevenção e tratamento de doenças relacionadas ao estresse (Kawabata et al., 2010).

Assim como a quercetina, outros flavonoides possuem efeitos relacionados a ansiedade. A *Passiflora incarnata*, que é utilizada devidos seus efeitos ansiolíticos e sedativos, possui um extrato rico em flavonoides apigenina, luteolina, a própria quercetina e kaempferol. *Davilla rugosa* também possui efeitos ansiolíticos que podem ser relacionados aos flavonóides presentes em seu extrato (Dovich, 2009). A rutina, um outro flavonoide pertencente à mesma família da quercetina, apresentou efeitos ansiolíticos em camundongos (Dovich, 2009). Há evidências de que tanto os flavonoides sintéticos quanto os naturais são agentes ansiolíticos potentes, sem os efeitos sedativos, miorelaxantes ou amnésicos, presentes nos benzodiazepínicos (Dovich, 2009), classe mais prescrita para crises de ansiedade.

O *grooming* de ratos é um comportamento repetitivo e estereotipado análogo ao TOC em humanos e a quercetina é uma droga com efeitos comportamentais pouco compreendidos e com potencial ansiolítico. Dessa forma, o presente trabalho se propõe investigar os efeitos da quercetina e do estresse sobre o comportamento de *grooming*, bem como sobre marcadores de estresse oxidativo.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos da quercetina sobre o comportamento de *grooming* induzido por um estressor, bem como nas alterações de estresse oxidativo em nível sistêmico.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Avaliar o efeito do tratamento agudo da quercetina sobre o *grooming* induzido por contenção
2. Avaliar o efeito do tratamento agudo da quercetina sobre o estresse oxidativo induzido por contenção

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Um total de 41 ratos Wistar do sexo masculino (200-220 g) foi utilizado no presente estudo. Os animais eram provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual de Londrina (UEL) e foram mantidos no Biotério do Departamento de Psicologia Geral e Análise do Comportamento (PGAC) por pelo menos dois dias antes do experimento para adaptação. Nesse biotério, foram mantidos em ciclo claro/escuro (12/12h, com luzes acesas às 07:00), em temperatura controlada ($23^{\circ}\pm 2^{\circ}\text{C}$) e sob regime *ad libitum* de água e comida. Os animais foram mantidos em gaiolas de polipropileno (28 cm X 17cm X 13 cm), em número de quatro por gaiola. Os experimentos foram realizados com aprovação da Comissão de Ética para o uso de animais, da UEL, sob o número 046.2020.

3.2 DROGA

O fármaco utilizado foi quercetina do fabricante Santa Cruz. A droga foi administrada via oral (gavagem) em dose de 300 mg/kg em salina com 20% de Tween 20 (Valério et al., 2009).

3.3 PROTOCOLO EXPERIMENTAL

No biotério local, os animais foram tratados com a quercetina ou o veículo 120 minutos antes do protocolo de estresse e a seguir foram transportados para o adjacente Laboratório de Psicobiologia. Lá foram deixados em uma sala com iluminação e temperatura semelhantes às do biotério por 120 minutos. Após esse período, parte dos animais foi submetida à contenção por 120 min. Os que não foram submetidos a esse procedimento permaneceram no mesmo local pelos mesmos 120 minutos. Para o procedimento de contenção, cada rato foi isolado individualmente em um aparato formado por uma tela de arame de formato cônico, o qual foi moldado ao corpo do animal de modo a restringir seus movimentos das patas e cabeça, impedindo a livre movimentação. Uma vez contidos nos cones de arame, os ratos foram pendurados verticalmente com a cabeça para cima em um suporte de madeira por 120 minutos. A posição vertical de permanência foi escolhida de modo a evitar que a defecação sujasse os pelos do animal. Findo o período de contenção, foram realizados os testes comportamentais. O primeiro foi o teste da caixa de acrílico, no qual os animais foram avaliados por 10 minutos. Os animais que não passaram pela contenção, foram levados da sala em que estavam diretamente para este teste. O segundo teste foi o *Marble Burying*, no qual os animais foram avaliados por 30 minutos. Ao final do segundo teste,

todos os animais foram submetidos à eutanásia. Para este experimento, os animais foram divididos em quatro grupos experimentais, sendo eles: 1) veículo, grupo que não foi submetido à contenção e nem recebeu o tratamento (n = 11); 2) veículo com contenção, grupo que foi submetido à contenção, mas não ao tratamento (n = 11); 3) tratamento, grupo que não foi submetido à contenção, mas foi submetido ao tratamento (n = 9) e 4) tratamento com contenção, grupo que foi submetido tanto à contenção, quanto ao tratamento (n = 10). Os grupos estão demonstrados na Figura 1A e o delineamento do estudo está demonstrado na figura 1B.

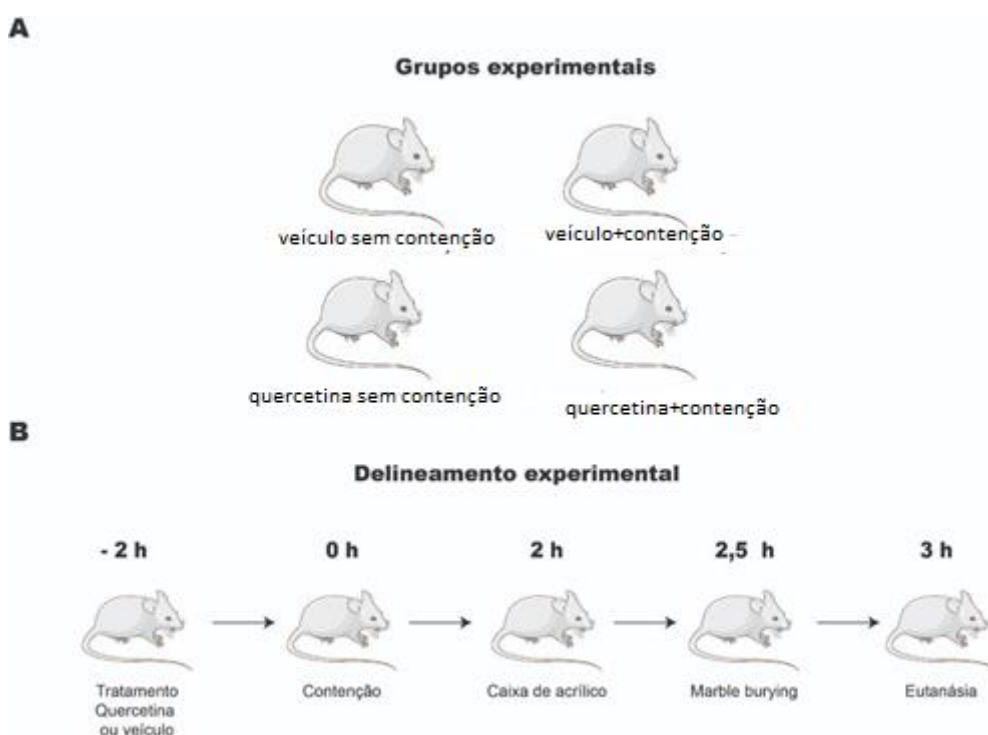


Figura 1. A: Grupos e delineamento experimental: 1) veículo sem contenção, grupo que não foi submetido à contenção e nem recebeu o tratamento; 2) veículo com contenção, grupo que foi submetido à contenção, mas não ao tratamento; 3) quercetina, grupo que não foi submetido à contenção, mas foi submetido ao tratamento e 4) quercetina com contenção, grupo que foi submetido tanto à contenção, quanto ao tratamento. B: delineamento experimental: os animais foram tratados de acordo com o seu grupo. 120 minutos após o tratamento, os animais dos grupos contidos foram submetidos à contenção, enquanto os animais dos outros grupos ficaram em uma sala separados. Após esse procedimento, os animais foram colocados na caixa de acrílico, para observação do *grooming* e, após esse teste, os animais passaram pelo teste do *Marble Burying* e, imediatamente após esse teste, foi retirada uma amostra de sangue por punção cardíaca e em seguida os animais foram eutanasiados por perfusão.

3.4 TESTES COMPORTAMENTAIS

3.4.1 Aparato Da Caixa De Acrílico

O teste foi realizado em uma caixa de acrílico transparente (30 cm X 30 cm X 30cm),

onde o animal foi mantido por 10 minutos. Um espelho inclinado foi disposto embaixo da caixa e, dessa forma, uma câmera filmadora posicionada frontalmente a caixa gravou imagens do animal a partir dessa posição e de baixo para cima, através do espelho. O objetivo desse teste é observar as medidas de *grooming*.

As medidas comportamentais avaliadas foram:

- 1) Duração do *grooming* rostral – movimento de lambar as patas e fricção no nariz, vibrissas e orelhas
- 2) Duração do *grooming* corporal – movimentos de lambar e friccionar com as patas e focinhos, outras regiões do corpo
- 3) Duração total do *grooming* – *grooming* rostral e *grooming* corporal somados
- 4) Frequência de cadeias estereotipadas – realização em sequência cefalocaudal das 4 fases da cadeia – Fase I: movimentos elípticos em torno do nariz; Fase II: movimentos unilaterais feitos por uma das patas perto das vibrissas e abaixo dos olhos; Fase III: movimentos bilaterais, feito pelas duas patas simultaneamente até a altura das orelhas; Fase IV: lambidas no corpo e genitais, transição para o *grooming* corporal (Berridge et al., 2005).
- 5) Frequência da locomoção – A caixa foi dividida em 4 quadrantes e a passagem das quatro patas de um quadrante para o outro serviu de critério para o registro de uma locomoção.

3.4.2 Teste Marble Burying

Este teste avalia o comportamento repetitivo do animal. O teste foi escolhido por ter se mostrado sensível a manipulações farmacológicas que amenizam comportamentos compulsivos (Angoa-Pérez et al., 2013; Njung'e e Handley, 1991).

Para este teste, cada animal foi colocado em uma caixa de polipropileno (28 cm X 17cm X 13 cm), que continha cepilho (5 cm de profundidade) e 16 bolinhas de gude (2,5 cm diâmetro) uniformemente separadas na superfície. O animal permaneceu na caixa por 30 minutos, ao final da sessão foi retirado e foi feito registro fotográfico da caixa, a partir do qual a quantidade de bolinhas enterradas foi registrada.

3.5 AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO

Após o segundo teste comportamental, os animais foram levados ao biotério e foram submetidos à anestesia com isoflurano a 3%. Uma amostra de sangue (1 ml) foi retirada por punção cardíaca para avaliação de estresse oxidativo. Após esse procedimento, os animais foram submetidos à eunatásia por perfusão com solução salina 0,9% para realização de coletas de tecido para outras análises (dados não mostrados)

3.5.1 Ensaio ABTS e FRAP

Amostras de plasma foram coletadas. A capacidade da amostra para resistir a danos oxidativos foi determinada através da capacidade de eliminação de radicais livres pelo método ABTS modificado (Re et al., 1999). Para o ensaio de ABTS, 500 µl de solução ABTS foi diluído em 20 ml de solução salina de tampão fosfato pH 7.4 (PBS). Em seguida, 200 µl de uma solução diluída de ABTS foi misturado a 50 µl de plasma em microplaca de 96 poços. Após 6 minutos de incubação à temperatura ambiente, a absorbância das amostras foi medida em espectrofotômetro de microplacas (ThermoScientific) em comprimento de onda de 730 nm. Para avaliação do ensaio FRAP, foi utilizado 50 µl de plasma nizada e 150 µL do reagente de FRAP. A absorbância foi mensurada em 595 nm. Os resultados foram equiparados contra uma curva padrão de Trolox (1.5-30 nM, concentração final) e foram expressos como equivalentes de Trolox por mg de proteína nas 2 avaliações.

3.5.2 Estimativa Da Peroxidação Lipídica Pela Formação De Malondialdeído (MDA)

A peroxidação lipídica foi estimada pela determinação dos níveis de substâncias reativas com o ácido tiobarbitúrico, conforme adaptado por Fattori et al. (2015). Para isso, ácido tricloroacético (10%) foi adicionado ao plasma para precipitar proteínas. Essa mistura foi mantida em banho-maria a 100°C por 15 minutos. Malondealdeído, um produto intermediário da lipoperoxidação, foi determinado pela diferença de absorbância a 535 e 572 nm. Os resultados foram expressos como TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico) (nmol por mg de proteína).

3.6 ANÁLISES DE DADOS

Os dados foram analisados quanto à duração dos comportamentos *grooming* rostral, *grooming* corporal e total, frequência de cadeias estereotipadas e de locomoção e quantidade de bolinhas enterradas no teste *Marble Burying*. As medidas bioquímicas avaliadas foram FRAP, ABTS e TBARS. Antes das demais análises, os dados foram testados quanto a normalidade (Teste de *Shapiro-Wilk*) e homogeneidade (Teste de *Levene*), para esses testes o critério foi $p < 0,01$. Após, os dados foram submetidos à ANOVA de duas vias. Comparações múltiplas foram feitas com o teste post hoc de Tukey.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados serão apresentados no artigo a seguir, que será submetido à revista *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*.

4.1 FLAVONOIDE QUERCETINA SIMULTANEAMENTE REGULA O ESTRESSE OXIDATIVO E INTENSIFICA O GROOMING INDUZIDO POR ESTRESSE DE CONTENÇÃO EM RATOS

Christiane Henriques Ferreira^a, Camila Rodrigues Ferraz^b, Marinus van Leewen^a, Eduardo Vignoto Fernandes^c, Guilherme Bracarense Filgueiras^a, Waldiceu Ap. Verri Junior^b, Celio Roberto Estanislau^a

^a Departamento de Psicologia Geral e Análise do Comportamento, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Rod. Celso Garcia Cid, Km480, PR445, CEP 86057-970, Londrina, Paraná, Brasil

^b Departamento de Ciências Patológicas, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Rod. Celso Garcia Cid, Km480, PR445, CEP 86057-970, Londrina, Paraná, Brasil

^c Unidade Acadêmica Especial de Ciências Biológicas. Laboratório de Anatomia Humana e Comparativa, Universidade Federal de Jataí, Campus Jatobá, BR364, Km195, nº 3800, Cidade Universitária, CEP 75801615, Jataí, GO, Brasil

Autor para correspondência: Tel +55 43 3371-4227. E-mail – celio.estanislau@gmail.com. Departamento de Psicologia Geral e Análise do Comportamento, Universidade Estadual de Londrina. Rod. Celso Garcia Cid, Km480, PR445, CEP 86057-970, Londrina, Paraná, Brasil

E-mail de cada autor:

Christiane Henriques Ferreira – christianehenriques@gmail.com

Camila Rodrigues Ferraz – camila_ferraz96@hotmail.com

Marinus Van Leewen – marinusvl@gmail.com

Eduardo Vignoto Fernandes – eduardovignoto@ufj.edu.br

Guilherme Bracarense Filgueiras – guilhermen1@gmail.com

Waldiceu Ap. Verri Junior – waldiceujr@yahoo.com.br

Celio Roberto Estanislau – celio.estanislau@gmail.com

Highlights

Grooming corporal está relacionado com o processo de desexcitação
Estresse de contenção aumenta o estresse oxidativo
QUER pode ser útil em doenças relacionadas ao estresse
QUER intensifica o grooming induzido por estresse

Resumo

A quercetina (QUER) é um potente flavonoide antioxidante cujos efeitos comportamentais ainda são pouco conhecidos. O *grooming* é um comportamento repetitivo e estereotipado de autocuidado em roedores, que é intensificado na presença de um estressor. O estresse de contenção causa alterações tanto no *grooming* quanto no estresse oxidativo em nível sistêmico. Neste estudo, os efeitos da quercetina sobre o *grooming* induzido por estresse de contenção foi avaliado, bem como sobre marcadores de estresse oxidativo. 41 ratos receberam uma administração oral de veículo ou QUER (300 mg/kg). Depois de 120 minutos, o grupo submetido ao estresse, ficou por 120 minutos contido dentro de um cone de arame, enquanto o grupo não submetido ao estresse permanecia em uma sala separada. Ao final desse período, os animais foram colocados em uma caixa de acrílico, onde ficaram por 10 minutos e as medidas de *grooming* e locomoção foram avaliadas. Na sequência, os animais foram submetidos ao teste *Marble Burying* e, imediatamente após, foram anestesiados e uma amostra de sangue foi colhida. Dessa forma, houve quatro grupos: veículo sem contenção, veículo+contenção, tratamento sem contenção e tratamento+contenção. São apresentados resultados de análise de variância de duas vias seguida por teste de *Tukey*. A interação entre QUER e estresse levou a redução da locomoção, efeito mais visível na comparação entre os dois grupos estressados. O *grooming* dirigido à superfície corporal foi aumentado nos animais submetidos ao tratamento e à contenção. QUER, quando combinada ao estresse, levou a um aumento no componente rostral e na duração total do *grooming*. As análises bioquímicas apontaram que o estresse de contenção aumentou o estresse oxidativo e a QUER reverteu esse efeito. Os resultados com a QUER confirmam seu potencial antioxidante e anti-inflamatório, além de sugerir um potencial terapêutico para doenças relacionadas ao estresse, uma vez que a QUER diminuiu o processo inflamatório induzido pelo estresse e foi capaz de alterar a resposta comportamental a ele.

Palavras- chave: quercetina; *grooming*; estresse de contenção, estresse oxidativo

1 Introdução

O comportamento de limpeza (*grooming*) é uma atividade muito comum no comportamento de ratos e com várias possibilidades de uso em modelos animais (Kalueff et al., 2016). É um comportamento inato, envolvido com a manutenção da higiene e outros processos, como termorregulação, comunicação social e redução da excitação (*dearousal*) (Estanislau et al., 2019; Estanislau et al., 2013; Spruijt et al., 1992);).

Embora tenha uma função de limpeza, a ocorrência de *grooming* é frequentemente melhor explicada pelo contexto no qual ocorre do que pelo estado da pele ou da pelagem. Mais especificamente, o *grooming* pode ser exacerbado durante (e após) a exposição a diferentes tipos de estressores (Spruijt et al. 1992). Em roedores, é observado na forma de uma sequência de movimentos, geralmente dirigidos às partes do corpo com um padrão cefalocaudal progressivo, começando pela cabeça, seguindo para o corpo e por fim para as regiões genitais e cauda (Kalueff et al., 2016). Essa sequência pode ser afetada por manipulações experimentais, como lesões de vias dopaminérgicas no trato nigroestriatal, administração de drogas dopaminérgicas, mutação genética ou estresse psicológico (Kalueff et al., 2016).

Segundo Spruijt et al (1992), o *grooming* pode ser modulado por diferentes contextos, sendo que um deles é a exposição a situações estressoras. Segundo Buynitsky e Mostofsky (2009), a contenção e a imobilização estão entre os métodos mais utilizados para induzir estresse em roedores e isso ocorre porque esses procedimentos são baratos, indolores e possuem uma execução fácil, além de não causar debilitação duradoura no animal. O estresse por contenção é considerado psicogênico, pois não envolve dor ou qualquer lesão tecidual.

Além de afetar o comportamento e diversos parâmetros fisiológicos, vale notar que o estresse de contenção é capaz de alterar marcadores de estresse oxidativo (Buynitsky e Mostofsky, 2009), bem como induzir a neuroinflamação (Munhoz et al., 2008). Na neuroinflamação, os principais atores são as células da glia (Refolo e Stefanova, 2019), que, após sua ativação, se envolvem na produção de citocinas inflamatórias, que mantêm e potencializam o quadro inflamatório. A neuroinflamação é reconhecida como o principal componente patológico de praticamente todas as doenças neurodegenerativas e também tem sido um foco de pesquisas sobre estresse (Crowley et al., 2016) .

Há evidências de que, no estresse, o processo de neuroinflamação ocorre em paralelo com alterações comportamentais. Foi observado que ratos tratados com minociclina, um antagonista de micróglia, apresentam diminuição de comportamentos

de *grooming* induzidos por estresse crônico ultramoderado e que tal efeito é acompanhado por redução da neuroinflamação e dos níveis de GABA do hipocampo (Zhang et al., 2019). O NFκB é uma via de transcrição importante para neuroinflamação, uma vez que orquestra a transcrição de vários genes inflamatórios, incluindo TNF-α e IL-1β (Shih et al., 2015). Em um ciclo de feedback, essas citocinas também têm a capacidade de desencadear a ativação clássica de NFκB (Shih et al., 2015). Dessa forma, considerando que a ativação da microglia envolve a sinalização intracelular via NFκB (Popiolek-Barczyk e Mika, 2016), isso indica que a neuroinflamação induzida por estresse ocorre por meio da liberação de mediadores inflamatórios, como TNF-α e IL-1β das células glia ativadas.

O estresse oxidativo pode ser definido como um desequilíbrio entre a remoção e a formação de radicais livres no organismo, gerando um estado pró-oxidante (Braz, 2015). Ele ocorre quando há uma produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (EROs) e de nitrogênio (ENOs) (Rahal et al., 2014). O Sistema Nervoso Central (SNC) é particularmente sensível ao estresse oxidativo, pois conta com baixos níveis de antioxidantes se comparado a outros tecidos, requer grande necessidade de oxigênio para suas reações e possui uma grande quantidade de ácidos graxos poli-insaturados (Braz, 2015; Salim, 2017; Silva, 2012). Com efeito, o estresse oxidativo está envolvido em várias doenças neurodegenerativas, como Alzheimer e acidente vascular encefálico (David et al, 2016) e em transtornos psiquiátricos, como depressão e ansiedade (Salim, 2014) e TOC (Behl et al., 2010).

As discussões acerca da fisiopatologia de transtornos como TOC, depressão e ansiedade concentram-se principalmente em explicações relativas a anormalidades nos neurotransmissores GABA e 5HT. No entanto, as explicações referentes ao estresse oxidativo também são importantes, principalmente porque o estresse psicológico resulta na produção de EROs, especialmente no cérebro.

Estudos têm sugerido uma relação entre alguns tipos de transtornos relacionados à ansiedade, como transtorno obsessivo-compulsivo (TOC) e pânico, ao estresse oxidativo (Salim, 2014). Tais pesquisas demonstram que o metabolismo oxidativo pode afetar na regulação da ansiedade, depressão e esquizofrenia (Salim, 2014). Modelos animais têm sido úteis para clarear o papel do estresse oxidativo nos comportamentos tipo-ansiosos em roedores. Há pesquisas demonstrando um papel causal do estresse oxidativo nos comportamentos tipo-ansiosos e que o tratamento com antioxidantes parece prevenir a ansiedade induzida por essas drogas (Salim, 2014). Por exemplo, foi observado que a vitamina A induziu estresse oxidativo em ratos adultos, além de ser ansiogênica, ao diminuir a locomoção no teste do campo aberto (de Oliveira et al., 2007).

Noções relativas a estresse oxidativo têm se mostrado importante para a compreensão do TOC. Behl et al., (2010) defendem que sua relação com o estresse oxidativo está nos núcleos da base. Outros estudos relacionam o aumento de estresse oxidativo com o comportamento tipo obsessivo-compulsivo em roedores. Esses estudos demonstram que um dos meios pelos quais os inibidores seletivos da recaptção de serotonina contribuem para controlar o comportamento tipo obsessivo-compulsivo é através do aumento dos níveis de óxido nítrico no cérebro (Kar e Choudhury, 2016). Um estudo com uma linhagem específica de camundongos (*deer mouse*), que apresenta comportamentos estereotipados espontâneos (saltos repetitivos, padrões de corrida e cambalhotas para trás), analisou a relação desses comportamentos com marcadores de estresse oxidativo e demonstrou que uma deficiência do sistema de glutatona no córtex pré-frontal está envolvida nesse comportamento (Güldenpfennig et al., 2011).

Dentre os antioxidantes utilizados para combater o estresse oxidativo, uma classe importante é a dos flavonoides. Eles são amplamente encontrados em vegetais, frutas e em algumas bebidas. Um importante flavonoide é a quercetina (3,3',4',5',7 – pentahydroxyflavone), que é o flavonoide mais abundante na dieta humana, além de estar presente em mais de 20 plantas (David et al., 2016). Ela é conhecida pelas suas atividades anti-inflamatórias, anti-hipertensivas, vasodilatadoras, entre outras (David et al., 2016). Um dos principais efeitos biológicos da quercetina é a atividade antioxidante, que ocorre através da inibição do processo de formação de radicais livres por meio do sequestro de radicais de oxigênio, além de atividade de quelação de ferro (Behling et al., 2004).

O estresse oxidativo causa ativação adicional de NFκB e superprodução de citocinas inflamatórias. A ativação do sistema Nrf2/ARE desempenha um papel importante na interrupção deste ciclo (Ahmed et al., 2017), pois NFκB compete com o Nrf2 pela proteína de ligação CREB (Liu et al., 2008). Dessa forma, o efeito anti-inflamatório da quercetina está relacionado ao bloqueio da ativação do NFκB e à ativação da via de sinalização antioxidante Nrf2/HO-1 (Guazelli et al., 2013).

O *grooming* de ratos é um comportamento repetitivo e estereotipado análogo ao TOC em humanos e a quercetina é uma droga com efeitos comportamentais pouco compreendidos e com potencial ansiolítico. Dessa forma, o presente trabalho se propõe investigar os efeitos da quercetina e do estresse sobre o comportamento de grooming, bem como sobre marcadores de estresse oxidativo.

2 Materiais e métodos

2.1 Animais

Os experimentos foram realizados com 41 ratos machos Wistar (200-220g). Os animais

eram provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual de Londrina (UEL) e foram mantidos no Biotério do Departamento de Psicologia Geral e Análise do Comportamento (PGAC) por pelo menos dois dias antes do experimento para adaptação. Nesse biotério, foram mantidos em ciclo claro/escuro (12/12h, com luzes acesas às 07:00), em temperatura controlada ($23^{\circ}\pm 2^{\circ}\text{C}$) e sob regime *ad libitum* de água e comida. Os animais foram mantidos em gaiolas de polipropileno (28 cm X 17cm X 13 cm), em número de quatro por gaiola. Os experimento foi aprovado pela Comissão de Ética para Uso de Animais, da UEL, sob o número 046.2020.

2.2 Droga

A droga utilizada foi quercetina do fabricante Santa Cruz. A droga foi administrada via oral (gavagem) em dose de 300 mg/kg em salina com 20% de Tween 20 (Valério et al., 2009).

2.3 Protocolo experimental

No biotério local, os animais foram tratados com a droga ou o veículo 120 minutos antes do protocolo de estresse e a seguir foram transportados para o adjacente Laboratório de Psicobiologia. Lá foram deixados em uma sala com iluminação e temperatura semelhantes às do biotério por 120 minutos. Após esse período, os animais foram submetidos à contenção por 120 min. Os que não foram submetidos a esse procedimento permaneceram no mesmo local pelos mesmos 120 minutos. Para o procedimento de contenção, cada rato foi isolado individualmente em um aparato formado por uma tela de arame de formato cônico, o qual foi moldado ao corpo do animal de modo a restringir seus movimentos das patas e cabeça, impedindo a livre movimentação. Uma vez contidos nos cones de arame, os ratos foram pendurados verticalmente com a cabeça para cima em um suporte de madeira por 120 minutos. A posição vertical de permanência foi escolhida de modo a evitar que a defecação sujasse os pelos do animal. Findo o período de contenção, foram realizados os testes comportamentais. O primeiro foi o teste da caixa de acrílico, no qual os animais foram avaliados por 10 minutos. Os animais que não passaram pela contenção, foram levados da sala em que estavam diretamente para este teste. O segundo teste foi o *Marble Burying*, no qual os animais foram avaliados por 30 minutos. Ao final do segundo teste, todos os animais foram submetidos à eutanásia. Para este experimento, os animais foram distribuídos entre quatro grupos experimentais, sendo eles: 1) veículo, grupo que não foi submetido à contenção e nem recebeu o tratamento ($n = 11$); 2) veículo com contenção, grupo que foi submetido à contenção, mas não ao tratamento ($n = 11$); 3) tratamento, grupo que não foi submetido à contenção, mas foi submetido ao tratamento

(n = 9) e 4) tratamento com contenção, grupo que foi submetido tanto à contenção, quanto ao tratamento (n = 10). Os grupos estão demonstrados na Figura 1A e o delineamento do estudo está demonstrado na figura 1B

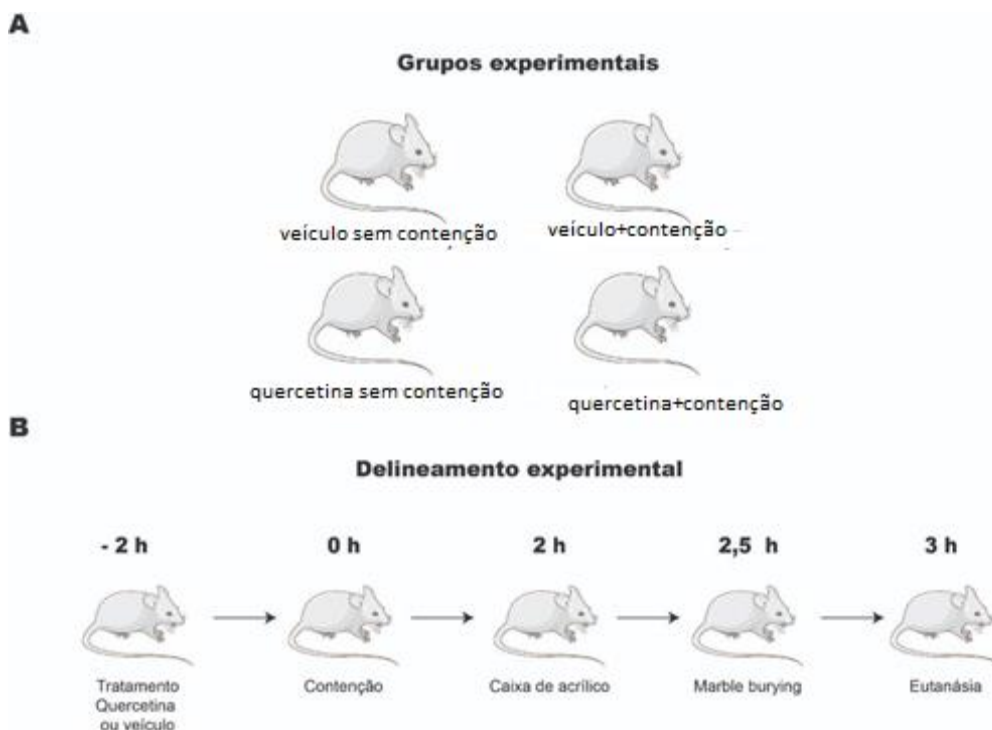


Figura 1. Grupos e delineamento experimental. A: grupos experimentais: 1) veículo sem contenção, grupo que não foi submetido à contenção e nem recebeu o tratamento; 2) veículo com contenção, grupo que foi submetido à contenção, mas não ao tratamento; 3) quercetina, grupo que não foi submetido à contenção, mas foi submetido ao tratamento e 4) quercetina com contenção, grupo que foi submetido tanto à contenção, quanto ao tratamento. B: delineamento experimental: os animais foram tratados de acordo com o seu grupo. 120 minutos após o tratamento, os animais dos grupos contidos foram submetidos à contenção, enquanto os animais dos outros grupos ficaram em uma sala separados. Após esse procedimento, os animais foram colocados na caixa de acrílico, para observação do *grooming* e, após esse teste, os animais passaram pelo teste do *marble burying* e, imediatamente após esse teste, foi retirada uma amostra de sangue por punção cardíaca e em seguida os animais foram eutanasiados por perfusão.

2.4 Testes comportamentais

2.4.1 Teste da caixa de acrílico

O teste foi realizado em uma caixa de acrílico transparente (30 cm X 30 cm X 30cm), onde o animal foi mantido por 10 minutos. Um espelho inclinado foi disposto embaixo da caixa e, dessa forma, uma câmera filmadora posicionada frontalmente a caixa gravou imagens do animal a partir dessa posição e de baixo para cima, através do espelho.

As medidas comportamentais avaliadas foram:

- 1) Duração do *grooming* rostral – movimento de lambar as patas e fricção no nariz, vibrissas e orelhas
- 2) Duração do *grooming* corporal – movimentos de lambar e friccionar com as patas e focinhos, outras regiões do corpo
- 3) Duração total do *grooming* – *grooming* rostral e *grooming* corporal somados
- 4) Frequência de cadeias estereotipadas – realização em sequência cefalocaudal das 4 fases da cadeia – Fase I: movimentos elípticos em torno do nariz; Fase II: movimentos unilaterais feitos por uma das patas perto das vibrissas e abaixo dos olhos; Fase III: movimentos bilaterais, feito pelas duas patas simultaneamente até a altura das orelhas; Fase IV: lambidas no corpo e genitais, transição para o *grooming* corporal (Berridge et al., 2005).
- 5) Frequência da locomoção – A caixa foi dividida em 4 quadrantes e a passagem das quatro patas de um quadrante para o outro serviu de critério para o registro de uma locomoção.

2.4.2 Teste Marble Burying

Este teste avalia o comportamento repetitivo do animal. O teste foi escolhido por ter se mostrado sensível a manipulações farmacológicas que amenizam comportamentos compulsivos (Angoa-Pérez et al., 2013; Njung'e e Handley, 1991).

Para este teste, cada animal foi colocado em uma caixa de polipropileno (28 cm X 17cm X 13 cm), que continha cepilho (5 cm de profundidade) e 16 bolinhas de gude (2,5 cm diâmetro) uniformemente separadas na superfície. O animal permaneceu na caixa por 30 minutos, ao final da sessão foi retirado e foi feito registro fotográfico da caixa, a partir do qual a quantidade de bolinhas enterradas foi registrada.

2.5 Avaliação do estresse oxidativo

Após o segundo teste comportamental, os animais foram levados ao biotério e foram submetidos à anestesia com isoflurano a 3%. Uma amostra de sangue (1 ml) foi retirada por punção cardíaca para avaliação de estresse oxidativo. Após esse procedimento, os animais foram submetidos à eunatásia por perfusão com solução salina 0,9% para realização de coletas de tecido para outras análises (dados não mostrados).

2.5.1 Ensaio ABTS e FRAP

Amostras de plasma foram coletadas. A capacidade da amostra para resistir a danos oxidativos foi determinada através da capacidade de eliminação de radicais livres pelo método ABTS modificado (Re et al., 1999). Para o ensaio de ABTS, 500 µl de solução

ABTS foi diluído em 20 ml de solução salina de tampão fosfato pH 7.4 (PBS). Em seguida, 200 µl de uma solução diluída de ABTS foi misturado a 50 µl de plasma em microplaca de 96 poços. Após 6 minutos de incubação à temperatura ambiente, a absorbância das amostras foi medida em espectrofotômetro de microplacas (ThermoScientific) em comprimento de onda de 730 nm. Para avaliação do ensaio FRAP, foi utilizado 50 µl de plasma nizada e 150 µL do reagente de FRAP. A absorbância foi mensurada em 595 nm. Os resultados foram equiparados contra uma curva padrão de Trolox (1.5-30 nM, concentração final) e foram expressos como equivalentes de Trolox por mg de proteína nas 2 avaliações.

2.5.3 Estimativa da peroxidação lipídica pela formação de malondialdeído (MDA)

A peroxidação lipídica foi estimada pela determinação dos níveis de substâncias reativas com o ácido tiobarbitúrico, conforme adaptado por Fattori et al. (2015). Para isso, ácido tricloroacético (10%) foi adicionado ao plasma para precipitar proteínas. Essa mistura foi mantida em banho-maria a 100°C por 15 minutos. Malondealdeído, um produto intermediário da lipoperoxidação, foi determinado pela diferença de absorbância a 535 e 572 nm. Os resultados foram expressos como TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico) (nmol por mg de proteína).

2.6 Análises de dados

Os dados comportamentais foram analisados quanto à duração dos comportamentos *grooming* rostral, *grooming* corporal e total, frequência de cadeias estereotipadas e de locomoção e quantidade de bolinhas enterradas no teste *Marble Burying*. As medidas bioquímicas avaliadas foram ABTS, FRAP e TBARS. Antes das demais análises, os dados foram testados quanto a normalidade (Teste de *Shapiro-Wilk*) e homogeneidade (Teste de *Levine*), para esses testes o critério foi $p < 0,01$. Tendo passado nesses testes, os dados foram submetidos à ANOVA de duas vias. Comparações múltiplas foram feitas com o teste post hoc de *Tukey*.

3. Resultados¹

3.1 – *Efeitos da QUER na locomoção.* A Figura 2 mostra os resultados referentes a locomoção. O estresse de contenção teve efeito, segundo ANOVA ($F_{[1,41]} = 7,59$; $p < 0,05$). O mesmo teste também mostrou efeito na interação entre o tratamento e o estresse ($[F_{[1,41]} = 4,40$; $p < 0,05$). Tais efeitos se refletiram na diminuição de cruzamentos de quadrantes do grupo quercetina+contenção, quando comparado com o grupo quercetina sem contenção (*Tukey*: $p < 0,05$). Como os animais gastaram mais tempo fazendo *grooming*, eles não se locomoveram muito.

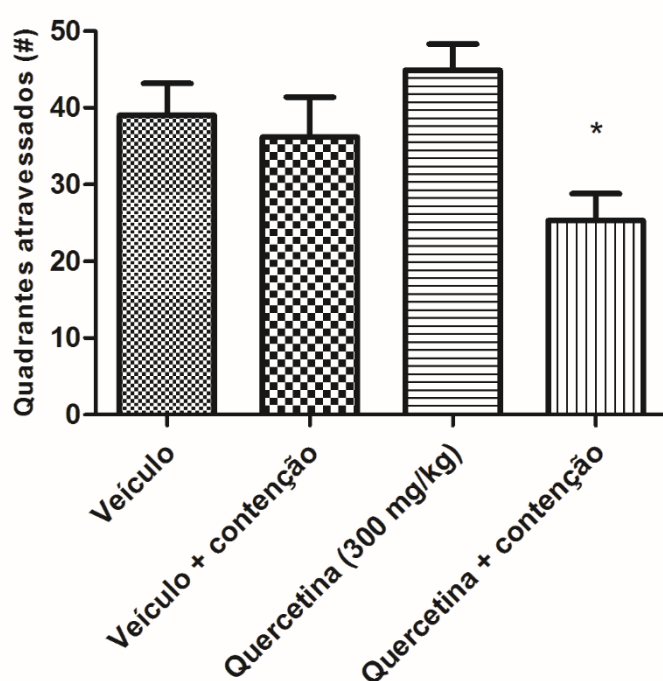


Fig. 2 Quercetina, quando combinada a estresse, diminui a locomoção na caixa de acrílico. Após a administração do veículo ou QUER (300 mg/kg), os animais foram mantidos em uma sala adjacente do laboratório ou submetidos à contenção por 120 minutos e testados na caixa de acrílico por 10 minutos. Os resultados apresentam a média e o erro padrão da média de cada grupo. *, $p < 0,05$ quando comparado com o grupo tratado sem contenção.

¹ Nas normas da revista as imagens devem vir na sessão de figuras, no entanto, para facilitar a compreensão dos resultados, as imagens seguem os resultados.

3.2 – *Grooming rostral*. A Figura 3 mostra os resultados referentes ao *grooming* rostral. O estresse de contenção teve efeito, segundo ANOVA ($F_{[1,41]} = 4,94$; $p < 0,05$), assim como a interação estresse e tratamento, também segundo ANOVA ($[F_{1,41}] = 4,34$; $p < 0,05$). Tais efeitos foram observados principalmente no grupo quercetina+contenção, que teve aumento da duração do *grooming* rostral, quando comparado com o grupo quercetina sem contenção (*Tuckey*: $p < 0,05$).

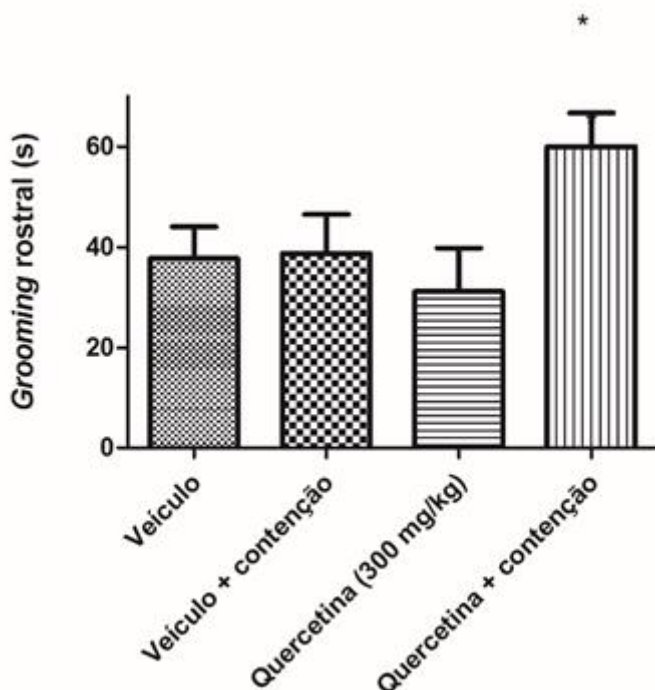


Fig. 3. Duração de *grooming* rostral. Após a administração do veículo ou QUER (300 mg/kg), os animais foram mantidos em uma sala adjacente do laboratório ou submetidos à contenção por 120 minutos, seguido do teste da caixa de acrílico, por 10 minutos. Os resultados apresentam a média e o erro padrão da média de cada grupo. *, $p < 0,05$ quando comparado com o grupo quercetina sem contenção.

3.3– *QUER* aumenta *Grooming* corporal. A Figura 4 mostra os resultados referentes ao *grooming* corporal. O estresse de contenção teve efeito, segundo ANOVA ($F_{[1,41]} = 80,75$; $p < 0,001$). ANOVA também mostrou efeito do tratamento ($F_{[1,41]} = 23,11$; $p < 0,001$), assim como da interação entre tratamento e estresse ($F_{[1,41]} = 19,55$; $p < 0,001$). O estresse de contenção mostrou efeito no grupo veículo+contenção, aumentando a duração do *grooming* corporal, quando comparado com o grupo veículo sem contenção (*Tuckey*: $p < 0,05$). Também houve efeito do tratamento no grupo quercetina+contenção, mostrando que a quercetina aumentou significativamente a duração do *grooming* corporal neste grupo, quando comparado com o grupo veículo+contenção (*Tuckey*: $p < 0,001$). Houve ainda efeito do estresse no grupo quercetina+contenção, quando comparado ao grupo quercetina sem contenção.

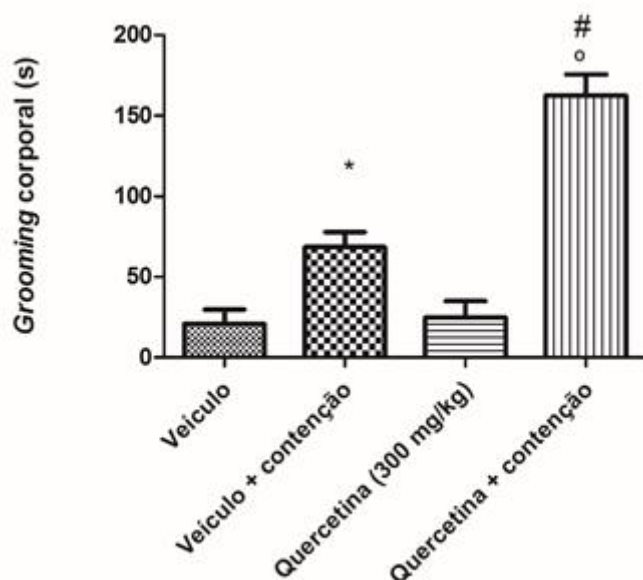


Fig. 4. Duração de *grooming* corporal na caixa de acrílico. Após a administração do veículo ou QUER (300 mg/kg), os animais foram mantidos em uma sala adjacente do laboratório ou submetidos à contenção por 120 minutos, seguido do teste da caixa de acrílico por 10 minutos. Os resultados apresentam a média e o erro padrão da média de cada grupo. *, $p < 0,05$ quando comparado com o grupo veículo sem contenção; °, $p < 0,05$ quando comparado com o grupo quercetina sem contenção; #, $p < 0,05$ quando comparado com o grupo veículo+contenção.

3.4 – *QUER* aumenta a duração total de *grooming*. A Figura 5 mostra os resultados referentes à duração total de *grooming*. A contenção teve efeito, conforme observado na ANOVA ($F_{[1,41]} = 59,50$; $p < 0,001$). O mesmo teste também mostrou um efeito do tratamento ($F_{[1,41]} = 17,05$; $p < 0,001$), bem como um efeito da interação entre o tratamento e o estresse ($F_{[1,41]} = 18,55$; $p < 0,001$). Esses efeitos podem ser observados no grupo quercetina+contenção, que mostrou um aumento na duração total do *grooming*, quando comparado com o grupo veículo+contenção (Tuckey: $p < 0,001$) e com o grupo quercetina sem contenção (Tuckey: $p < 0,001$).

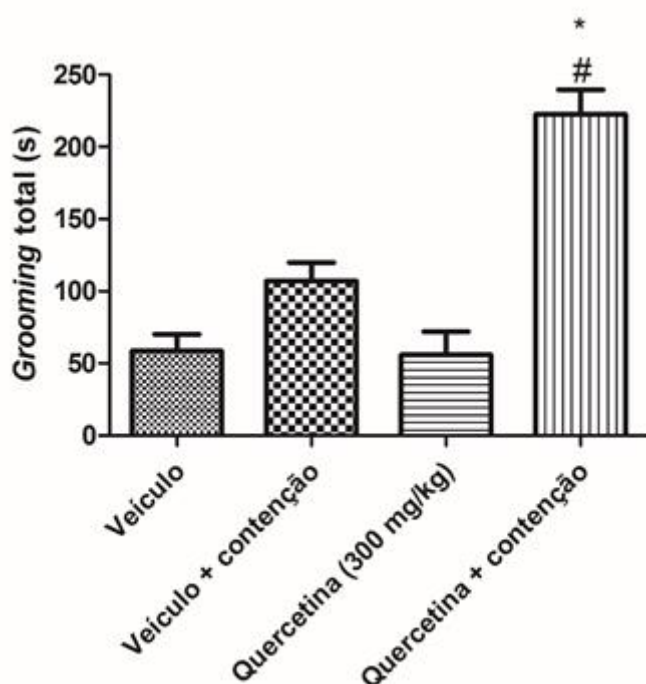


Fig. 5. Duração total de *grooming* na caixa de acrílico. Após administração do veículo ou QUER (300 mg/kg), os animais foram mantidos em uma sala adjacente do laboratório ou submetidos à contenção, seguido do teste da caixa de acrílico. Os resultados apresentam a média e o erro padrão da média de cada grupo. *, $p < 0,05$ quando comparado com o grupo quercetina sem contenção; #, $p < 0,05$ quando comparado com o grupo veículo+contenção.

3.5– *Frequência de cadeias estereotipadas*. A Figura 6 mostra os resultados referentes às cadeias estereotipadas. O estresse de contenção teve efeito, segundo ANOVA ($F_{[1,41]} = 23,91$; $p < 0,001$). Tal efeito pode ser observado no grupo veículo+contenção, que teve uma diminuição na frequência das cadeias, quando comparado com o grupo veículo sem contenção (*Tuckey*: $p < 0,05$). O efeito também pode ser visto no grupo quercetina+contenção, que teve uma diminuição na frequência das cadeias, quando comparado com o grupo quercetina sem contenção (*Tuckey*: $p < 0,05$).

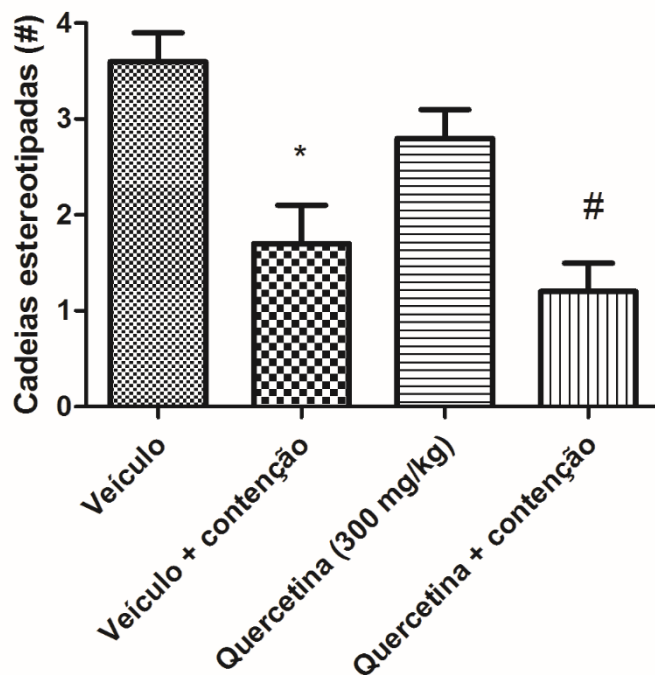


Fig. 6. Frequência de cadeias estereotipadas de *grooming* na caixa de acrílico. Após administração do veículo ou QUER (300 mg/kg), os animais foram mantidos em uma sala adjacente do laboratório ou submetidos à contenção, seguido do teste da caixa de acrílico. Os resultados apresentam a média e o erro padrão da média de cada grupo. *, $p < 0,05$ quando comparado com o grupo veículo sem contenção; #, $p < 0,05$ quando comparado com o grupo quercetina sem contenção.

3.6– *Quercetina não interfere no teste Marble Burying*. Os resultados referentes ao teste *Marble burying* podem ser vistos na Figura 7. Os ratos foram tratados com QUER (300 mg/kg, via oral) ou tween 20%, 120 minutos antes da contenção. As variáveis manipuladas não afetaram essa medida.

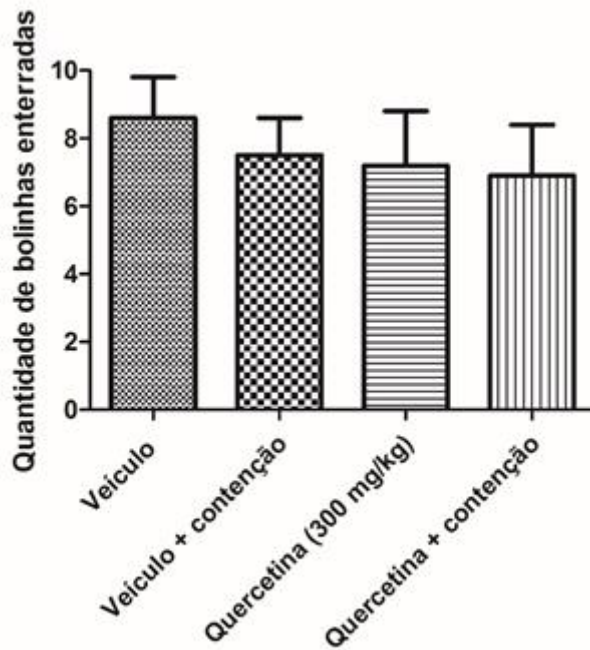


Fig. 7. QUER não interfere no comportamento de enterramento no teste do *Marble Burying*. Após a administração do veículo ou QUER (300 mg/kg), os animais foram mantidos em uma sala adjacente do laboratório ou submetidos à contenção por 120 minutos, ao teste da caixa de acrílico por 10 minutos e ao teste *Marble Burying* por 30 minutos.

3.7 – *QUER* aumenta o antioxidante FRAP. Os resultados referentes ao ensaio FRAP podem ser vistos na Figura 8 Neste ensaio, a quantidade de ferro sequestrado foi avaliada e a ANOVA mostrou efeito da interação entre tratamento e estresse ($F_{[1,27]} = 9,14 ; p < 0,01$). De acordo com o teste post hoc de Tukey, isso pode ser atribuído ao grupo veículo+contenção, que teve os níveis antioxidantes diminuídos, quando comparados com os dos grupos veículo sem contenção ($p < 0,01$) e quercetina+contenção ($p < 0,01$). Assim, ao se comparar esses grupos, pode-se constatar que o estresse de contenção aumentou o estresse oxidativo e o tratamento com a quercetina reverteu esse efeito.

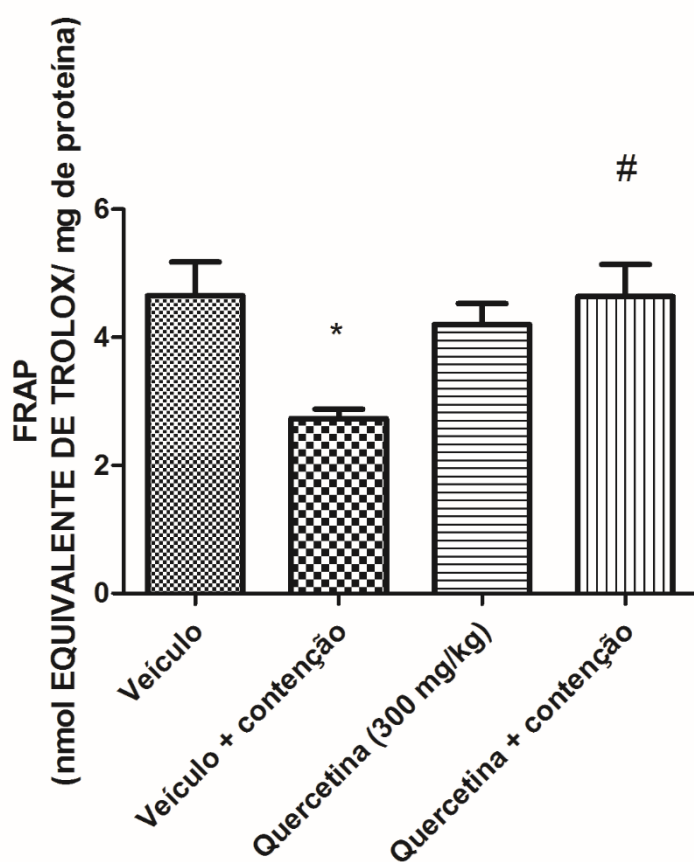


Fig. 8. Ensaio FRAP. Após administração do veículo ou QUER (300 mg/kg), os animais foram mantidos em uma sala adjacente do laboratório ou submetidos à contenção por 120 minutos, seguidos do teste da caixa de acrílico, por 10 minutos e do teste *Marble Burying*, por 30 minutos. Imediatamente após os dois testes, uma amostra de sangue foi retirada. Os resultados apresentam a média e o erro padrão da média de cada grupo. *, $p < 0,05$ quando comparado com o grupo veículo sem contenção; #, $p < 0,05$ quando comparado como grupo veículo+contenção.

3.8 – QUER aumenta o antioxidante ABTS. A Figura 9 mostra os resultados referentes ao ensaio ABTS. Neste ensaio, a habilidade dos antioxidantes em sequestrar o ânion radical de longa vida ABTS foi avaliada e a ANOVA mostrou efeito do estresse ($F_{[1,26]} = 5,305$; $p < 0,05$), do tratamento ($F_{[1,26]} = 4,644$; $p < 0,05$) e interação entre droga e estresse ($F_{[1,26]} = 20,47$; $p < 0,01$). De acordo com o teste *post hoc* de Tukey, isso pode ser atribuído ao grupo veículo+contenção, que teve os níveis antioxidantes diminuídos, quando comparado com os grupos veículo sem contenção ($p < 0,01$) e quercetina+contenção ($p < 0,05$). Assim, ao se comparar esses grupos, pode-se constatar que o estresse de contenção aumentou o estresse oxidativo e o tratamento com a quercetina reverteu esse efeito.

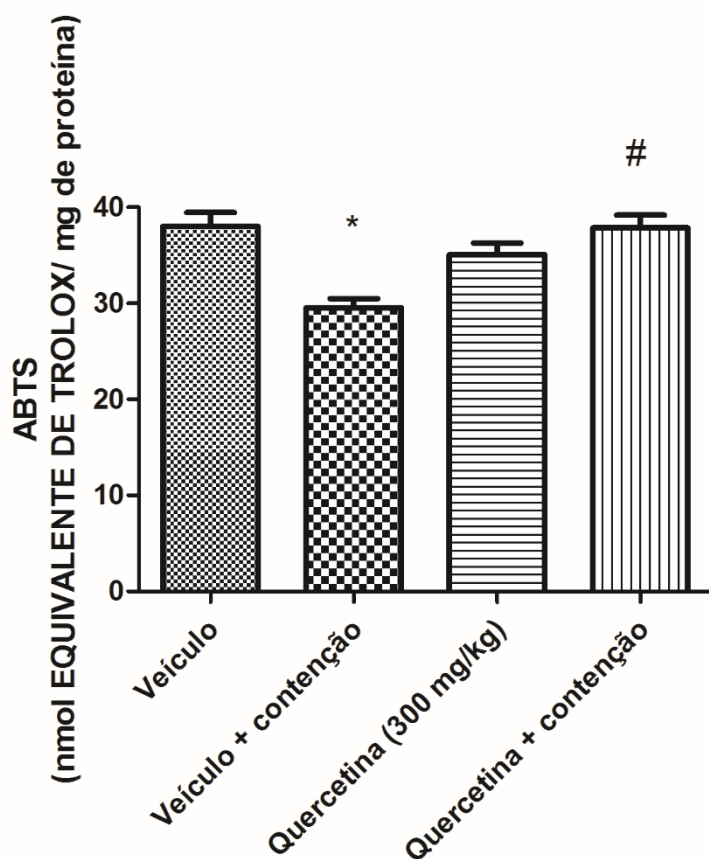


Fig. 9. Ensaio ABTS. Após administração do veículo ou QUER (300 mg/kg), os animais foram mantidos em uma sala adjacente do laboratório ou submetidos à contenção por 120 minutos, seguidos do teste da caixa de acrílico, por 10 minutos e do teste Marble Burying, por 30 minutos. Imediatamente após os dois testes, uma amostra de plasma foi retirada. Os resultados apresentam a média e o erro padrão da média de cada grupo. *, $p < 0,05$ quando comparado com o grupo veículo sem contenção; #, $p < 0,05$ quando comparado com o grupo veículo+contenção.

3.9 – QUER diminui níveis de MDA. A Figura 10 mostra os resultados referentes ao ensaio TBARS. Neste ensaio, a quantificação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, entre elas o MDA, como subproduto da peroxidação lipídica, foi avaliada e a ANOVA mostrou efeito do estresse ($F_{[1,28]} = 7,552$; $p < 0,05$) e interação entre droga e estresse ($F_{[1,28]} = 7,583$; $p < 0,05$). De acordo com o teste *post hoc* de Tukey, isso pode ser atribuído ao grupo veículo+contenção, que teve os níveis pró oxidantes aumentados, quando comparado com os grupos veículo sem contenção ($p < 0,01$) e quercetina+contenção ($p < 0,05$). Assim, ao se comparar esses grupos, pode-se constatar que o estresse de contenção aumentou o estresse oxidativo e o tratamento com a quercetina reverteu esse efeito.

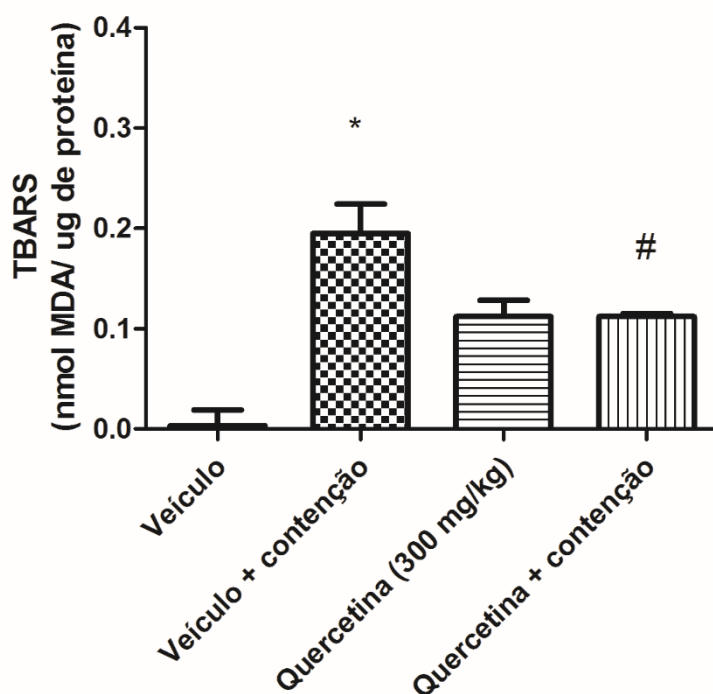


Fig. 10. Ensaio TBARS. Após administração do veículo ou QUER (300 mg/kg), os animais foram mantidos em uma sala adjacente do laboratório ou submetidos à contenção por 120 minutos, seguidos do teste da caixa de acrílico, por 10 minutos e do teste Marble Burying, por 30 minutos. Imediatamente após os dois testes, uma amostra de plasma foi retirada. Os resultados apresentam a média e o erro padrão da média de cada grupo. *, $p < 0,05$ quando comparado com o grupo veículo sem contenção; #, $p < 0,05$ quando comparado com o grupo veículo+contenção.

4. Discussão

Este trabalho teve como objetivo investigar o efeito da quercetina sobre o comportamento de *grooming* induzido por um estressor e as alterações de estresse oxidativo em nível sistêmico. O *grooming* é um comportamento que pode ser alterado pelo estresse (Kalueff et al., 2016). A contenção é reconhecida como um procedimento estressante para ratos (Buynitsky & Mostofsky, 2009) e, confirmando essa afirmação, em nosso estudo o *grooming* mostrou-se sensível a essa experiência estressante. Houve efeito tanto do fármaco quanto do estresse no *grooming* corporal, tendo esse componente sido aumentado nos animais submetidos a ambas as variáveis, quando comparados com os submetidos ao tratamento, mas não a contenção. Houve ainda efeito significativo do estresse e da interação estresse e droga no *grooming* rostral, na duração total houve efeito tanto do estresse, quanto do tratamento, bem como interação entre os dois fatores. Já em relação ao estresse oxidativo, o estresse de contenção induziu o estresse oxidativo, possivelmente por meio de um processo neuroinflamatório e a quercetina, por meio de sua ação antioxidante, reverteu esse efeito.

O *grooming* não é um modelo de um transtorno específico, mas sim um modelo de estereotipia e compulsão, pois apresenta padrões repetitivos e estereotipados (Estanislau et al., 2019), o que o torna uma boa ferramenta para estudo translacional de comportamentos compulsivos (Kalueff et al., 2016). Além disso, é sabido que situações estressoras exacerbam o comportamento estereotipado (Kalueff et al., 2016) e que o *grooming* pode ser considerado resposta de enfrentamento a essas situações. Essa resposta está envolvida na diminuição da excitação (*dearousal*) decorrente de uma situação de estresse (Estanislau et al., 2019, Estanislau et al., 2013; Spruijt et al., 1992), uma vez que o *grooming* ocorre após um período de excitação. A desexcitação é um processo que decorre do término ou habituação a uma situação estressante (Spruijt et al., 1992), que no caso do presente trabalho, foi a contenção. Em humanos, a compulsão se apresenta como forma de cessar a obsessão e é seguida por uma sensação de alívio da ansiedade provocada por estresse (APA, 2013). O componente corporal do *grooming* é uma medida sensível da resposta de *coping* a estressores ambientais (Veloso et al., 2016). Os autores defendem essa ideia, baseando-se em seus resultados nos testes de labirinto de cruz elevado e *marble burying*, que são testes cujos contextos permitem que o animal se engaje em alguma estratégia de *coping* comportamental (Veloso et al., 2016). No presente trabalho, isso pode ser visto no componente corporal, uma vez que o estresse mostrou efeito nesse componente. Pode-se sugerir que esse comportamento está envolvido na volta ao estado basal. Houve aumento desse comportamento nos grupos submetidos à contenção e tratamento.

Como o estresse no presente estudo foi manipulado experimentalmente, a diferença entre os grupos estressados pode ser atribuída ao tratamento com a quercetina.

O *grooming* ocorre imediatamente após um estresse agudo (Estanislau et al., 2019), por isso, se supõe uma relação com o *dearousal*, ou seja, que esse comportamento está envolvido em processos que fazem com que o animal volte para um estado basal de atividade. No componente corporal, houve efeito do fármaco, do estresse e da interação entre os dois fatores. Dessa forma, seria plausível afirmar que a droga potencializou o *grooming* corporal e, tendo em vista esse resultado, seria possível supor ainda que a quercetina possui um possível efeito ansiolítico, uma vez que exacerba um comportamento presente quando o animal volta para o seu estado basal de atividade. Embora o presente trabalho não tenha realizado testes de ansiedade, inferir isso se torna possível devido à aludida relação entre *grooming* corporal e o processo de habituação. A caixa de acrílico é um contexto de novidade e o *grooming* corporal (que está relacionado ao *dearousal*) tem sua duração aumentada em ambientes novos. Dessa forma, faz sentido os animais terem gasto mais tempo nesse componente, que também teve efeito do estresse e da interação entre os dois fatores.

O contexto da caixa de acrílico é um contexto de novidade para todos os animais (o que faz com que o animal se engaje em uma resposta de enfrentamento a essa situação estressora), no entanto, não existiu apenas o estresse da novidade, pois antes deste teste, os animais foram submetidos à contenção, que entende-se ser um procedimento extremamente estressante para os animais. No componente corporal, os animais submetidos apenas à contenção, fizeram mais *grooming* do que os animais que não foram submetidos ao protocolo de estresse. No entanto, os animais que foram submetidos tanto ao estresse quanto ao tratamento com a droga, gastaram um tempo significativamente maior nesse componente do que os outros grupos. Isso também reforça a ideia de que a quercetina potencializou o *grooming* corporal, o que relaciona essa droga ao processo de desexcitação e, por consequência, a um potencial ansiolítico.

As células da glia, que estão ativadas no processo de neuroinflamação, aumentam a produção de $TNF\alpha$ e IL-1 via NF κ B, dessa forma, é possível inferir que a contenção aumenta a produção de citocinas pelas células da glia e aumenta a produção de estresse oxidativo, o que culmina no processo de neuroinflamação (Refolo e Stefanova, 2019; Shih et al., 2015). Assim, com o aumento da atividade antioxidante via Nrf2, há um bloqueio da atividade inflamatória pela diminuição da transcrição gênica de citocinas inflamatórias e pelo aumento das defesas antioxidantes. Dessa forma, no presente estudo, a quercetina diminuiu o processo inflamatório induzido pelo estresse, o que nos faz supor que foi em decorrência do aumento da atividade antioxidante,

também relacionada à atividade anti-inflamatória, sendo possível inferir que ocorre a inibição dessas vias.

O estresse de contenção causa danos oxidativos ao organismo, além de induzir neuroinflamação (Buynitsky and Mostofsky, 2009; Munhoz et al., 2008). No presente trabalho, o plasma dos animais foi analisado e os animais tratados com quercetina mostraram alteração no ABTS, FRAP e TBARS. Tanto no ensaio ABTS, quanto no FRAP, o estresse de contenção aumentou o estresse oxidativo e o tratamento com quercetina (300 mg/kg) reverteu esse efeito. Já no ensaio TBARS, houve uma diminuição do MDA, que é um subproduto da peroxidação lipídica, ou seja, o estresse de contenção causou a peroxidação lipídica e o tratamento com quercetina reverteu esse efeito.

O estresse pode desencadear uma cascata inflamatória, elevando concentrações plasmáticas e cerebrais de citocinas pró-inflamatórias, como TNF α , IFN, IL-1 β , IL-6 (Sevastre-Berghian et al., 2018). Essas citocinas podem desencadear a ativação do eixo HPA e do Sistema Nervoso Simpático, resultando numa liberação de cortisol/corticosterona. Foi administrado o extrato de *Hypericum maculatum* e *Hypericum perforatum* por 21 dias em um modelo animal de ansiedade, induzido pela droga ansiogênica FG 7142, tendo a quercetina como controle positivo. Dessa forma, a injeção de FG 7142 foi acompanhada do aumento das citocinas IL- α e IL-1 β e a quercetina reverteu tal aumento (Sevastre-Berghian et al., 2018). É possível que tal reversão tenha se dado por seu efeito anti-inflamatório, o que sugere que essas citocinas podem estar envolvidas na ansiedade. No presente estudo, nem as citocinas e nem a corticosterona foram avaliados, no entanto, por meio dos ensaios ABTS, FRAP e TBARS, podemos comparar esses resultados aos obtidos no estudo citado, uma vez que a quercetina reverteu o estresse oxidativo causado pelo estresse e o possível processo inflamatório, também induzido pelo estresse.

O estresse de contenção induz o processo de neuroinflamação (Munhoz et al., 2008). Este processo também está presente em transtornos relacionados a estereotipia, como Tourette e TOC (Mercadante et al., 2004). Após quatro horas de exposição ao estresse de imobilização, o NF κ B, que é uma importante via de transcrição no processo inflamatório, é ativado (Madrugal et al., 2003). Também há demonstrações de que após uma hora de estresse de imobilização, os níveis de TNF- α estão aumentados no tecido cerebral de ratos (Lorenzo et al., 2002). No presente estudo, os animais foram submetidos à contenção por 120 minutos, tempo que é suficiente para indução do estresse oxidativo e do possível processo neuroinflamatório.

Em um experimento com ratos machos, no qual os animais receberam 50mg/Kg de quercetina e 30 min depois passaram por estresse de contenção e imersão na água

(water immersion restraint – WIR) durante 3 horas, foi demonstrado que administração oral da quercetina atenua a ativação do eixo HPA em resposta ao estresse agudo. O estudo mostrou que houve um aumento nos níveis plasmáticos dos hormônios corticosterona e adrenocorticotrópico induzido pelo WIR e que a quercetina suprimiu essa liberação, demonstrando um potencial importante da quercetina na prevenção e tratamento de doenças relacionadas ao estresse (Kawabata et al., 2010). O presente estudo não fez avaliações hormonais, no entanto, os resultados obtidos parecem ser coerentes com o estudo de Kawabata et al (2010), uma vez que a quercetina aumentou o *grooming* corporal nos animais submetidos à contenção, demonstrando uma relação com o estresse. Nesse sentido, o fato de que animais tratados com quercetina e estressados gastaram mais tempo no componente corporal (que é realizado pelo animal enquanto este volta para seu estado basal de atividade) do que os outros grupos nos sugere que a quercetina possa de alguma forma ser utilizada em doenças relacionadas ao estresse. Conforme o artigo citado, os mecanismos de ação da quercetina ainda são pouco conhecidos, dessa forma, estudos futuros serão necessários para investigar as relações aqui aludidas. A relação entre a quercetina e o estresse ainda não está clara. Sendo assim, estudos objetivando elucidar essa relação, também são importantes.

O presente estudo avaliou ainda o teste *Marble Burying*. Nesse teste não houve efeitos significantes. Esse teste, segundo Thomas et al. (2009), reflete um comportamento repetitivo e perseverante de uma forma melhor do que reflete comportamentos tipo-ansiosos, ao contrário do *grooming*, que, além de estar ligado à perseveração, pode estar relacionado à ansiedade (Estanislau et al., 2019). No presente estudo, o *grooming* apresentou alterações, ao contrário do *Marble Burying*. Isso pode também ter ocorrido pelo fato da análise das medidas de *grooming* (no teste da caixa de acrílico) ter ocorrido imediatamente após o fim da contenção, diferentemente do teste *Marble Burying*, que foi o segundo teste a que os animais foram submetidos. Há pesquisas que mostram o efeito do estresse nesse teste mesmo havendo um intervalo de até 40 minutos entre a indução do estresse e o teste (Domingues et al., 2019; Sousa et al., 2018), no entanto, isso não pode ser visto no presente estudo. Nos dois estudos citados, os animais ficaram quatro horas na contenção, enquanto no presente estudo, os animais ficaram na contenção por duas horas. Essa diferença no tempo de indução do estresse pode ser a justificativa pra ausência de resultados nesse teste no presente estudo.

5 Conclusão

Os animais que foram estressados tenderam a fazer mais *grooming*, sendo que os animais tratados com a quercetina apresentaram uma duração de *grooming* ainda maior. O *grooming*, estando relacionado com o processo de desexcitação, podemos

sugerir que o fármaco intensifica esse processo. Dessa forma, o presente estudo demonstrou que a quercetina potencializou o *grooming* corporal, que está relacionado tanto com uma resposta de enfrentamento ao estresse, quanto com um período de desexcitação, o que sugere que essa droga poderia ser útil em doenças relacionadas ao estresse.

Conforme pode ser observado, o estresse de contenção causou estresse oxidativo e induziu um processo neuroinflamatório e o tratamento com quercetina reverteu esse processo mostrando seu efeito antioxidante e anti-inflamatório. No entanto, tanto a relação entre quercetina e *grooming*, quanto sua relação com o modelo de estresse de contenção, ainda não está estabelecida, mostrando a necessidade de pesquisas que possam fazer essas elucidações, tais como avaliação de citocinas que poderiam estar aumentadas. O presente estudo indica que a quercetina possui efeitos no SNC em situações estressoras. Estudos que possam explicar como o efeito antioxidante da quercetina modula o *grooming* são necessários. A relação dela com a ansiedade também precisa ser melhor investigada, para que seus mecanismos de ação na ansiedade possam ser melhor compreendidos. Esses estudos são importantes, uma vez que compostos naturais tendem a apresentar menos efeitos colaterais e apresentam um potencial abusivo menor e, dessa forma, elucidar a relação da quercetina com a ansiedade pode ser benéfico de várias formas.

6 Referências bibliográficas

- Ahmed, S.M.U., Luo, L., Namani, A., Wang, X.J., Tang, X., 2017. Nrf2 signaling pathway: Pivotal roles in inflammation. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* 1863, 585–597. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2016.11.005>
- Angoa-Pérez, M., Kane, M.J., Briggs, D.I., Francescutti, D.M., Kuhn, D.M., 2013. Marble burying and nestlet shredding as tests of repetitive, compulsive-like behaviors in mice. *J. Vis. Exp.* 50978. <https://doi.org/10.3791/50978>
- Association, A.P., 2013. *Diagnostic and statistical manual of mental disorders (5th ed.)*. American Psychiatric Publishing, Arlington VA.
- Barbosa, K.B.F., Costa, N.M.B., De Cássia Gonçalves Alfenas, R., De Paula, S.O., Minim, V.P.R., Bressan, J., 2010. Estresse oxidativo: Conceito, implicações e fatores modulatórios. *Rev. Nutr.* 23, 629–643. <https://doi.org/10.1590/S1415-52732010000400013>
- Beatriz Behling, E., Maria Greggí Antunes, L., Lourdes Pires Bianchi, M., 2004. Flavonóide quercetina: aspectos gerais e ações biológicas. *Alim. Nutr.* 15, 3, 285-292.
- Behl, A., Swami, G., Sircar, S.S., Bhatia, M.S., Banerjee, B.D., 2010. Relationship of

- possible stress-related biochemical markers to oxidative/antioxidative status in obsessive-compulsive disorder. *Neuropsychobiology* 61, 210–214. <https://doi.org/10.1159/000306591>
- Berridge, K.C., Aldridge, J.W., Houchard, K.R., Zhuang, X., 2005. Sequential super-stereotypy of an instinctive fixed action pattern in hyper-dopaminergic mutant mice: a model of obsessive compulsive disorder and Tourette's. *BMC Biol.* 3, 4. <https://doi.org/10.1186/1741-7007-3-4>
- Braz, G.R., 2015. Avaliação do balanço oxidativo no tronco encefálico de ratos tratados com fluoxetina durante a lactação. 33 f. TCC (Graduação em Educação Física). Universidade Federal de Pernambuco, Vitória de Santo Antão
- Buynitsky, T., Mostofsky, D.I., 2009. Restraint stress in biobehavioral research: Recent developments. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 33, 1089–1098. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2009.05.004>
- Cordioli, A.V., 2014. As bases biológicas do TOC. *In: Cordioli, A.V. TOC*. Porto Alegre: Artmed
- Crowley, T., Cryan, J.F., Downer, E.J., O'Leary, O.F., 2016. Inhibiting neuroinflammation: The role and therapeutic potential of GABA in neuro-immune interactions. *Brain. Behav. Immun.* 54, 260–277. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2016.02.001>
- David, A.V., Arulmoli, R., Parasuraman, S., 2016. Overviews of biological importance of quercetin: A bioactive flavonoid. *Pharmacogn. Rev.* 10, 84–89. <https://doi.org/10.4103/0973-7847.194044>
- de Oliveira, M.R., Silvestrin, R.B., Mello e Souza, T., Moreira, J.C.F., 2007. Oxidative stress in the hippocampus, anxiety-like behavior and decreased locomotory and exploratory activity of adult rats: Effects of sub acute vitamin A supplementation at therapeutic doses. *Neurotoxicology* 28, 1191–1199. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2007.07.008>
- Domingues, M., Casaril, A.M., Birmann, P.T., Bampi, S.R., Lourenço, D. de A., Vieira, B.M., Dapper, L.H., Lenardão, E.J., Sonogo, M., Collares, T., Seixas, F.K., Brüning, C.A., Savegnago, L., 2019. Effects of a selanylimidazopyridine on the acute restraint stress-induced depressive- and anxiety-like behaviors and biological changes in mice. *Behav. Brain Res.* 366, 96–107. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2019.03.021>
- Dovich, S., 2009. Estudo dos efeitos dos flavonoides provenientes do quiabo (*Abelmoschus esculentum*) em comportamentos relacionados à ansiedade em camundongos. 147 f. Tese (Doutorado em Ciências dos alimentos). Universidade de São Paulo, São Paulo

- Estanislau, C., Díaz-Morán, S., Cañete, T., Blázquez, G., Tobeña, A., Fernández-Teruel, A., 2013. Context-dependent differences in grooming behavior among the NIH heterogeneous stock and the Roman high- and low-avoidance rats. *Neurosci. Res.* 77, 187–201. <https://doi.org/10.1016/j.neures.2013.09.012>
- Estanislau, C., Veloso, A.W.N., Filgueiras, G.B., Maio, T.P., Dal-Cól, M.L.C., Cunha, D.C., Klein, R., Carmona, L.F., Fernández-Teruel, A., 2019. Rat self-grooming and its relationships with anxiety, dearousal and perseveration: Evidence for a self-grooming trait. *Physiol. Behav.* 209, 112585. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2019.112585>
- Everly, J.G.S., Lating, J.M., 2013. A clinical guide to the treatment of the human stress, 3 ed. Springer US, New York.
- Fattori, V., Pinho-Ribeiro, F.A., Borghi, S.M., Alves-Filho, J.C., Cunha, T.M., Cunha, F.Q., Casagrande, R., Verri, W.A., 2015. Curcumin inhibits superoxide anion-induced pain-like behavior and leukocyte recruitment by increasing Nrf2 expression and reducing NF- κ B activation. *Inflamm. Res.* 64, 993–1003. <https://doi.org/10.1007/s00011-015-0885-y>
- Ferraz, C.R., Carvalho, T.T., Manchope, M.F., Artero, N.A., Rasquel-Oliveira, F.S., Fattori, V., Casagrande, R., Verri, W.A., 2020. Therapeutic potential of flavonoids in pain and inflammation: Mechanisms of action, pre-clinical and clinical data, and pharmaceutical development. *Molecules* 25. <https://doi.org/10.3390/molecules25030762>
- Filgueiras, J.C., Hippert, M.I.S., 1999. A polêmica em torno do conceito de estresse. *Psicol. Ciência e Profissão* 19, 40–51. <https://doi.org/10.1590/s1414-98931999000300005>
- Graybiel, A.M., Saka, E., 2002. A genetic basis for obsessive grooming. *Neuron* 33, 1–2. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(01\)00575-X](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(01)00575-X)
- Guazelli, C.F.S., Fattori, V., Colombo, B.B., Georgetti, S.R., Vicentini, F.T.M.C., Casagrande, R., Baracat, M.M., Verri, W.A., 2013. Quercetin-loaded microcapsules ameliorate experimental colitis in mice by anti-inflammatory and antioxidant mechanisms. *J. Nat. Prod.* 76, 200–208. <https://doi.org/10.1021/np300670w>
- Güldenpfennig, M., Wolmarans, D.W., du Preez, J.L., Stein, D.J., Harvey, B.H., 2011. Cortico-striatal oxidative status, dopamine turnover and relation with stereotypy in the deer mouse. *Physiol. Behav.* 103, 404–411. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2011.03.008>
- Kalueff, A. V., Stewart, A.M., Song, C., Berridge, K.C., Graybiel, A.M., Fentress, J.C., 2016. Neurobiology of rodent self-grooming and its value for translational neuroscience. *Nat. Rev. Neurosci.* 17, 45–59. <https://doi.org/10.1038/nrn.2015.8>

- Kar, S.K., Choudhury, I., 2016. An empirical review on oxidative stress markers and their relevance in obsessive-compulsive disorder. *Int. J. Nutr. Pharmacol. Neurol. Dis.* 6, 139–145. <https://doi.org/10.4103/2231-0738.191641>
- Kawabata, K., Kawai, Y., Terao, J., 2010. Suppressive effect of quercetin on acute stress-induced hypothalamic-pituitary-adrenal axis response in Wistar rats. *J. Nutr. Biochem.* 21, 374–380. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2009.01.008>
- Koolhaas, J.M., Bartolomucci, A., Buwalda, B., de Boer, S.F., Flügge, G., Korte, S.M., Meerlo, P., Murison, R., Olivier, B., Palanza, P., Richter-Levin, G., Sgoifo, A., Steimer, T., Stiedl, O., van Dijk, G., Wöhr, M., Fuchs, E., 2011. Stress revisited: A critical evaluation of the stress concept. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 35, 1291–1301. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2011.02.003>
- Liu, G.H., Qu, J., Shen, X., 2008. NF- κ B/p65 antagonizes Nrf2-ARE pathway by depriving CBP from Nrf2 and facilitating recruitment of HDAC3 to MafK. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 1783, 713–727. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2008.01.002>
- Lorenzo, P., Ph, M.D.D., Castrillo, A., Sc, B., Boscá, L., Ph, D., Leza, J.C., Ph, M.D.D., 2002. The increase in TNF- α levels is implicated in NF- κ B activation and inducible NOS expression in brain cortex after immobilization stress. *Neuropsychopharm* 26, 155-163
- Madrigal, J.L.M., Moro, M.A., Lizasoain, I., Lorenzo, P., Fernández, A.P., Rodrigo, J., Boscá, L., Leza, J.C., 2003. Induction of cyclooxygenase-2 accounts for restraint stress-induced oxidative status in rat brain. *Neuropsychopharmacology* 28, 1579–1588. <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1300187>
- Mercadante, M.T., Rosario-Campos, M.C., Quarantini, L.C., Sato, F.P., 2004. As bases neurobiológicas do transtorno obsessivo-compulsivo e da síndrome de Tourette. *J. Pediatr. (Rio. J.)* 80, 35–44. <https://doi.org/10.1590/s0021-75572004000300006>
- Munhoz, C.D., García-Bueno, B., Madrigal, J.L.M., Lepsch, L.B., Scavone, C., Leza, J.C., 2008. Stress-induced neuroinflammation: mechanisms and new pharmacological targets. *Braz J Med Biol Res.* 41, 1037-1046
- Njung'e, K., Handley, S.L., 1991. Evaluation of marble-burying behavior as a model of anxiety. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 38, 63–67. [https://doi.org/10.1016/0091-3057\(91\)90590-X](https://doi.org/10.1016/0091-3057(91)90590-X)
- Popielek-Barczyk, K., Mika, J., 2016. Targeting the Microglial Signaling Pathways: New Insights in the Modulation of Neuropathic pain. *Curr. Med. Chem.* 23, 2908–2928. <https://doi.org/10.2174/09298673236661606071>
- Prado, P.A. da F., 2012. Avaliação do possível efeito dual (antioxidante e/ou pró-oxidante) e ação neuroprotetora do ebselen, ácido caféico e memantina em células

- neurais (neuro-2^a) in vitro. 112 f. Dissertação (Mestrado em Neuriciências) Universidade Federal de Minas Geais, Belo Horizonte
- Rahal, A., Kumar, A., Singh, V., Yadav, B., Tiwari, R., Chakraborty, S., Dhama, K., 2014. Oxidative stress, prooxidants, and antioxidants: The interplay. *Biomed Res. Int.* 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/761264>
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C., 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med.* 26, 51.
- Refolo, V., Stefanova, N., 2019. Neuroinflammation and glial phenotypic changes in alpha-synucleinopathies. *Front. Cell. Neurosci.* 13, 1–17. <https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00263>
- Salim, S., 2017. Oxidative stress and the central nervous system. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 360, 201–205. <https://doi.org/10.1124/jpet.116.237503>
- Salim, S., 2014. Oxidative Stress and Psychological Disorders. *Curr. Neuropharmacol.* 12, 140–147.
- Selye, H., 1952. Stress and the general adaptation syndrome. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 3, 267–278. <https://doi.org/10.1159/000227975>
- Sevastre-Berghian, et al, 2018. Characterization and biological effects of Hypericum extracts on experimentally-induced-anxiety, oxidative stress and inflammation in rats. *J Physiol Pharmacol.* 69, 5, 789-800. <https://doi.org/10.26402/jpp.2018.5.13>
- Shih, R.H., Wang, C.Y., Yang, C.M., 2015. NF-kappaB signaling pathways in neurological inflammation: A mini review. *Front. Mol. Neurosci.* 8, 1–8. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2015.00077>
- Shrivastava, A., Kar, S.K., Sharma, E., Mahdi, A.A., Dalal, P.K., 2017. A study of oxidative stress biomarkers in obsessive compulsive disorder. *J. Obsessive. Compuls. Relat. Disord.* 15, 52–56. <https://doi.org/10.1016/j.jocrd.2017.09.004>
- Silva, A.I. da, 2012. Manipulação farmacológica neonatal do sistema serotoninérgico : um estudo comportamental e do estado oxidativo em ratos Manipulação farmacológica neonatal do sistema serotoninérgico : um estudo comportamental e do estado oxidativo em ratos. 82 f. Dissertação (Mestrado em Nutrição). Universidade Federal de Pernambuco, Recife
- Sousa, F.S.S., Birmann, P.T., Balaguez, R., Alves, D., Brüning, C.A., Savegnago, L., 2018. A-(Phenylselanyl) Acetophenone Abolishes Acute Restraint Stress Induced-Comorbid Pain, Depression and Anxiety-Related Behaviors in Mice. *Neurochem. Int.* 120, 112–120. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2018.08.006>
- Sousa, M.B.C., Silva, H.P.A., Galvão-Coelho, N.L., 2015. Resposta ao estresse: I. Homeostase e teoria da alostase. *Estud. Psicol.* 20, 2–11.

- <https://doi.org/10.5935/1678-4669.20150002>
- Spruijt, B.M., Van Hooff, J.A.R.A.M., Gispen, W.H., 1992. Ethology and neurobiology of grooming behavior. *Physiol. Rev.* 72, 825–852. <https://doi.org/10.1152/physrev.1992.72.3.825>
- Thomas, A., Burant, A., Bui, N., Graham, D., Yuva-Paylor, L. a, Paylor, R., 2009. Marble burying reflects a repetitive and perseverative behavior more than novelty-induced anxiety. *Psychopharmacology (Berl)*. 204, 361–373. <https://doi.org/10.1007/s00213-009-1466-y>
- Ulrich-Lai, Y.M., Herman, J.P., 2009. Neural regulation of endocrine and autonomic stress responses. *Nat. Rev. Neurosci.* 10, 397–409. <https://doi.org/10.1038/nrn2647>
- Valério, D.A., Georgetti, S.R., Magro, D.A., Casagrande, R., Cunha, T.M., Vicentini, F.T.M.C., Vieira, S.M., Fonseca, M.J.V., Ferreira, S.H., Cunha, F.Q., Verri, W.A., 2009. Quercetin reduces inflammatory pain: Inhibition of oxidative stress and cytokine production. *J. Nat. Prod.* 72, 1975–1979. <https://doi.org/10.1021/np900259y>
- Veloso, A.W.N., Filgueiras, G.B., Lorenzo, P., Estanislau, C., 2016. Modulation of grooming behavior in rats by different test situations. *Psychol. Neurosci.* 9. <https://doi.org/10.1037/pne0000038>
- Whiteford, H.A., Degenhardt, L., Rehm, J., Baxter, A.J., Ferrari, A.J., Erskine, H.E., Charlson, F.J., Norman, R.E., Flaxman, A.D., Johns, N., Burstein, R., Murray, C.J.L., Vos, T., 2013. Global burden of disease attributable to mental and substance use disorders: Findings from the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet* 382, 1575–1586. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)61611-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)61611-6)
- Zhang, C., Kalueff, A. V., Song, C., 2019. Minocycline ameliorates anxiety-related self-grooming behaviors and alters hippocampal neuroinflammation, GABA and serum cholesterol levels in female Sprague-Dawley rats subjected to chronic unpredictable mild stress. *Behav. Brain Res.* 363, 109–117. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2019.01.045>

5 CONCLUSÃO

Os animais que foram estressados tenderam a fazer mais grooming, sendo que os animais tratados com a quercetina apresentaram uma duração de grooming ainda maior. O grooming, estando relacionado com o processo de desexcitação, podemos sugerir que o fármaco intensifica esse processo. Dessa forma, o presente estudo demonstrou que a quercetina potencializou o *grooming* corporal, que está relacionado tanto com uma resposta de enfrentamento ao estresse, quanto com um período de desexcitação, o que sugere que essa droga poderia ser útil em doenças relacionadas ao estresse.

Conforme pode ser observado, o estresse de contenção causou estresse oxidativo e induziu um processo neuroinflamatório e o tratamento com quercetina reverteu esse processo mostrando seu efeito antioxidante e anti-inflamatório. No entanto, tanto a relação entre quercetina e o *grooming*, quanto sua relação com o modelo de estresse de contenção, ainda não está estabelecida, mostrando a necessidade de pesquisas que possam fazer essas elucidações, tais como avaliação de citocinas que poderiam estar aumentadas. O presente estudo indica que a quercetina possui efeitos no SNC em situações estressoras. Estudos que possam explicar como o efeito antioxidante da quercetina modula o *grooming* são necessários. A relação dela com a ansiedade também precisa ser melhor investigada, para que seus mecanismos de ação na ansiedade possam ser melhor compreendidos. Esses estudos são importantes, uma vez que compostos naturais tendem a apresentar menos efeitos colaterais e apresentam um potencial abusivo menor e, dessa forma, elucidar a relação da quercetina com a ansiedade pode ser benéfico de várias formas

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahmed, S.M.U., Luo, L., Namani, A., Wang, X.J., Tang, X., 2017. Nrf2 signaling pathway: Pivotal roles in inflammation. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* 1863, 585–597. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2016.11.005>
- Angoa-Pérez, M., Kane, M.J., Briggs, D.I., Francescutti, D.M., Kuhn, D.M., 2013. Marble burying and nestlet shredding as tests of repetitive, compulsive-like behaviors in mice. *J. Vis. Exp.* 50978. <https://doi.org/10.3791/50978>
- Association, A.P., 2013. Diagnostic and statistical manual of mental disorders (5th ed.). American Psychiatric Publishing, Arlington VA.
- Barbosa, K.B.F., Costa, N.M.B., De Cássia Gonçalves Alfenas, R., De Paula, S.O., Minim, V.P.R., Bressan, J., 2010. Estresse oxidativo: Conceito, implicações e fatores modulatórios. *Rev. Nutr.* 23, 629–643. <https://doi.org/10.1590/S1415-52732010000400013>
- Beatriz Behling, E., Maria Greggí Antunes, L., Lourdes Pires Bianchi, M., 2004. Flavonóide quercetina: aspectos gerais e ações biológicas. *Alim. Nutr.* 15, 3, 285-292.
- Behl, A., Swami, G., Sircar, S.S., Bhatia, M.S., Banerjee, B.D., 2010. Relationship of possible stress-related biochemical markers to oxidative/antioxidative status in obsessive-compulsive disorder. *Neuropsychobiology* 61, 210–214. <https://doi.org/10.1159/000306591>
- Berridge, K.C., Aldridge, J.W., Houchard, K.R., Zhuang, X., 2005. Sequential super-stereotypy of an instinctive fixed action pattern in hyper-dopaminergic mutant mice: a model of obsessive compulsive disorder and Tourette's. *BMC Biol.* 3, 4. <https://doi.org/10.1186/1741-7007-3-4>
- Braz, G.R., 2015. Avaliação do balanço oxidativo no tronco encefálico de ratos tratados com fluoxetina durante a lactação. 33 f. TCC (Graduação em Educação Física). Universidade Federal de Pernambuco, Vitória de Santo Antão
- Buynitsky, T., Mostofsky, D.I., 2009. Restraint stress in biobehavioral research: Recent developments. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 33, 1089–1098. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2009.05.004>
- Cordioli, A.V., 2014. As bases biológicas do TOC. *In: Cordioli, A.V. TOC*. Porto Alegre: Artmed
- Crowley, T., Cryan, J.F., Downer, E.J., O'Leary, O.F., 2016. Inhibiting neuroinflammation: The role and therapeutic potential of GABA in neuro-immune interactions. *Brain. Behav. Immun.* 54, 260–277. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2016.02.001>

- David, A.V., Arulmoli, R., Parasuraman, S., 2016. Overviews of biological importance of quercetin: A bioactive flavonoid. *Pharmacogn. Rev.* 10, 84–89. <https://doi.org/10.4103/0973-7847.194044>
- de Oliveira, M.R., Silvestrin, R.B., Mello e Souza, T., Moreira, J.C.F., 2007. Oxidative stress in the hippocampus, anxiety-like behavior and decreased locomotory and exploratory activity of adult rats: Effects of sub acute vitamin A supplementation at therapeutic doses. *Neurotoxicology* 28, 1191–1199. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2007.07.008>
- Domingues, M., Casaril, A.M., Birmann, P.T., Bampi, S.R., Lourenço, D. de A., Vieira, B.M., Dapper, L.H., Lenardão, E.J., Sonogo, M., Collares, T., Seixas, F.K., Brüning, C.A., Savegnago, L., 2019. Effects of a selanylimidazopyridine on the acute restraint stress-induced depressive- and anxiety-like behaviors and biological changes in mice. *Behav. Brain Res.* 366, 96–107. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2019.03.021>
- Dovich, S., 2009. Estudo dos efeitos dos flavonoides provenientes do quiabo (*Abelmoschus esculentum*) em comportamentos relacionados à ansiedade em camundongos. 147 f. Tese (Doutorado em Ciências dos alimentos). Universidade de São Paulo, São Paulo
- Estanislau, C., Díaz-Morán, S., Cañete, T., Blázquez, G., Tobeña, A., Fernández-Teruel, A., 2013. Context-dependent differences in grooming behavior among the NIH heterogeneous stock and the Roman high- and low-avoidance rats. *Neurosci. Res.* 77, 187–201. <https://doi.org/10.1016/j.neures.2013.09.012>
- Estanislau, C., Veloso, A.W.N., Filgueiras, G.B., Maio, T.P., Dal-Cól, M.L.C., Cunha, D.C., Klein, R., Carmona, L.F., Fernández-Teruel, A., 2019. Rat self-grooming and its relationships with anxiety, deactivation and perseveration: Evidence for a self-grooming trait. *Physiol. Behav.* 209, 112585. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2019.112585>
- Everly, J.G.S., Lating, J.M., 2013. A clinical guide to the treatment of the human stress, 3 ed. Springer US, New York.
- Fattori, V., Pinho-Ribeiro, F.A., Borghi, S.M., Alves-Filho, J.C., Cunha, T.M., Cunha, F.Q., Casagrande, R., Verri, W.A., 2015. Curcumin inhibits superoxide anion-induced pain-like behavior and leukocyte recruitment by increasing Nrf2 expression and reducing NF-κB activation. *Inflamm. Res.* 64, 993–1003. <https://doi.org/10.1007/s00011-015-0885-y>
- Ferraz, C.R., Carvalho, T.T., Manchope, M.F., Artero, N.A., Rasquel-Oliveira, F.S., Fattori, V., Casagrande, R., Verri, W.A., 2020. Therapeutic potential of flavonoids in pain and inflammation: Mechanisms of action, pre-clinical and clinical data, and

- pharmaceutical development. *Molecules* 25.
<https://doi.org/10.3390/molecules25030762>
- Filgueiras, J.C., Hippert, M.I.S., 1999. A polêmica em torno do conceito de estresse. *Psicol. Ciência e Profissão* 19, 40–51. <https://doi.org/10.1590/s1414-98931999000300005>
- Graybiel, A.M., Saka, E., 2002. A genetic basis for obsessive grooming. *Neuron* 33, 1–2. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(01\)00575-X](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(01)00575-X)
- Guazelli, C.F.S., Fattori, V., Colombo, B.B., Georgetti, S.R., Vicentini, F.T.M.C., Casagrande, R., Baracat, M.M., Verri, W.A., 2013. Quercetin-loaded microcapsules ameliorate experimental colitis in mice by anti-inflammatory and antioxidant mechanisms. *J. Nat. Prod.* 76, 200–208. <https://doi.org/10.1021/np300670w>
- Güldenpfennig, M., Wolmarans, D.W., du Preez, J.L., Stein, D.J., Harvey, B.H., 2011. Cortico-striatal oxidative status, dopamine turnover and relation with stereotypy in the deer mouse. *Physiol. Behav.* 103, 404–411. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2011.03.008>
- Kalueff, A. V., Stewart, A.M., Song, C., Berridge, K.C., Graybiel, A.M., Fentress, J.C., 2016. Neurobiology of rodent self-grooming and its value for translational neuroscience. *Nat. Rev. Neurosci.* 17, 45–59. <https://doi.org/10.1038/nrn.2015.8>
- Kar, S.K., Choudhury, I., 2016. An empirical review on oxidative stress markers and their relevance in obsessive-compulsive disorder. *Int. J. Nutr. Pharmacol. Neurol. Dis.* 6, 139–145. <https://doi.org/10.4103/2231-0738.191641>
- Kawabata, K., Kawai, Y., Terao, J., 2010. Suppressive effect of quercetin on acute stress-induced hypothalamic-pituitary-adrenal axis response in Wistar rats. *J. Nutr. Biochem.* 21, 374–380. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2009.01.008>
- Koolhaas, J.M., Bartolomucci, A., Buwalda, B., de Boer, S.F., Flügge, G., Korte, S.M., Meerlo, P., Murison, R., Olivier, B., Palanza, P., Richter-Levin, G., Sgoifo, A., Steimer, T., Stiedl, O., van Dijk, G., Wöhr, M., Fuchs, E., 2011. Stress revisited: A critical evaluation of the stress concept. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 35, 1291–1301. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2011.02.003>
- Liu, G.H., Qu, J., Shen, X., 2008. NF- κ B/p65 antagonizes Nrf2-ARE pathway by depriving CBP from Nrf2 and facilitating recruitment of HDAC3 to MafK. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 1783, 713–727. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2008.01.002>
- Lorenzo, P., Ph, M.D.D., Castrillo, A., Sc, B., Boscá, L., Ph, D., Leza, J.C., Ph, M.D.D., 2002. .The increase in TNF-alpha levels is implicated in NF-kappaB activation and inducible NOS expression in brain cortex after immobilization stress. *Neuropsychopharm* 26, 155-163

- Madrigal, J.L.M., Moro, M.A., Lizasoain, I., Lorenzo, P., Fernández, A.P., Rodrigo, J., Boscá, L., Leza, J.C., 2003. Induction of cyclooxygenase-2 accounts for restraint stress-induced oxidative status in rat brain. *Neuropsychopharmacology* 28, 1579–1588. <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1300187>
- Mercadante, M.T., Rosario-Campos, M.C., Quarantini, L.C., Sato, F.P., 2004. As bases neurobiológicas do transtorno obsessivo-compulsivo e da síndrome de Tourette. *J. Pediatr. (Rio. J)*. 80, 35–44. <https://doi.org/10.1590/s0021-75572004000300006>
- Munhoz, C.D., García-Bueno, B., Madrigal, J.L.M., Lepsch, L.B., Scavone, C., Leza, J.C., 2008. Stress-induced neuroinflammation: mechanisms and new pharmacological targets. *Braz J Med Biol Res*. 41, 1037-1046
- Njung'e, K., Handley, S.L., 1991. Evaluation of marble-burying behavior as a model of anxiety. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 38, 63–67. [https://doi.org/10.1016/0091-3057\(91\)90590-X](https://doi.org/10.1016/0091-3057(91)90590-X)
- Popiolek-Barczyk, K., Mika, J., 2016. Targeting the Microglial Signaling Pathways: New Insights in the Modulation of Neuropathic pain. *Curr. Med. Chem.* 23, 2908–2928. <https://doi.org/10.2174/09298673236661606071>
- Prado, P.A. da F., 2012. Avaliação do possível efeito dual (antioxidante e/ou pró-oxidante) e ação neuroprotetora do ebselen, ácido caféico e memantina em células neurais (neuro-2^a) in vitro. 112 f. Dissertação (Mestrado em Neurociências)Universidade Federal de Minas Geais,Belo Horizonte
- Rahal, A., Kumar, A., Singh, V., Yadav, B., Tiwari, R., Chakraborty, S., Dhama, K., 2014. Oxidative stress, prooxidants, and antioxidants: The interplay. *Biomed Res. Int.* 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/761264>
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C., 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med.* 26, 51.
- Refolo, V., Stefanova, N., 2019. Neuroinflammation and glial phenotypic changes in alpha-synucleinopathies. *Front. Cell. Neurosci.* 13, 1–17. <https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00263>
- Salim, S., 2017. Oxidative stress and the central nervous system. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 360, 201–205. <https://doi.org/10.1124/jpet.116.237503>
- Salim, S., 2014. Oxidative Stress and Psychological Disorders. *Curr. Neuropharmacol.* 12, 140–147.
- Selye, H., 1952. Stress and the general adaptation syndrome. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 3, 267–278. <https://doi.org/10.1159/000227975>
- Sevastre-Berghian, et al, 2018. Characterization and biological effects of Hypericum extracts on experimentally-induced-anxiety, oxidative stress and inflammation in

- rats. *J Physiol Pharmacol.* 69, 5, 789-800. <https://doi.org/10.26402/jpp.2018.5.13>
- Shih, R.H., Wang, C.Y., Yang, C.M., 2015. NF-kappaB signaling pathways in neurological inflammation: A mini review. *Front. Mol. Neurosci.* 8, 1–8. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2015.00077>
- Shrivastava, A., Kar, S.K., Sharma, E., Mahdi, A.A., Dalal, P.K., 2017. A study of oxidative stress biomarkers in obsessive compulsive disorder. *J. Obsessive. Compuls. Relat. Disord.* 15, 52–56. <https://doi.org/10.1016/j.jocrd.2017.09.004>
- Silva, A.I. da, 2012. Manipulação farmacológica neonatal do sistema serotoninérgico : um estudo comportamental e do estado oxidativo em ratos Manipulação farmacológica neonatal do sistema serotoninérgico : um estudo comportamental e do estado oxidativo em ratos. 82 f. Dissertação (Mestrado em Nutrição). Universidade Federal de Pernambuco, Recife
- Sousa, F.S.S., Birmann, P.T., Balaguez, R., Alves, D., Brüning, C.A., Savegnago, L., 2018. A-(Phenylselanyl) Acetophenone Abolishes Acute Restraint Stress Induced- Comorbid Pain, Depression and Anxiety-Related Behaviors in Mice. *Neurochem. Int.* 120, 112–120. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2018.08.006>
- Sousa, M.B.C., Silva, H.P.A., Galvão-Coelho, N.L., 2015. Resposta ao estresse: I. Homeostase e teoria da alostase. *Estud. Psicol.* 20, 2–11. <https://doi.org/10.5935/1678-4669.20150002>
- Spruijt, B.M., Van Hooff, J.A.R.A.M., Gispen, W.H., 1992. Ethology and neurobiology of grooming behavior. *Physiol. Rev.* 72, 825–852. <https://doi.org/10.1152/physrev.1992.72.3.825>
- Thomas, A., Burant, A., Bui, N., Graham, D., Yuva-Paylor, L. a, Paylor, R., 2009. Marble burying reflects a repetitive and perseverative behavior more than novelty-induced anxiety. *Psychopharmacology (Berl)*. 204, 361–373. <https://doi.org/10.1007/s00213-009-1466-y>
- Ulrich-Lai, Y.M., Herman, J.P., 2009. Neural regulation of endocrine and autonomic stress responses. *Nat. Rev. Neurosci.* 10, 397–409. <https://doi.org/10.1038/nrn2647>
- Valério, D.A., Georgetti, S.R., Magro, D.A., Casagrande, R., Cunha, T.M., Vicentini, F.T.M.C., Vieira, S.M., Fonseca, M.J.V., Ferreira, S.H., Cunha, F.Q., Verri, W.A., 2009. Quercetin reduces inflammatory pain: Inhibition of oxidative stress and cytokine production. *J. Nat. Prod.* 72, 1975–1979. <https://doi.org/10.1021/np900259y>
- Veloso, A.W.N., Filgueiras, G.B., Lorenzo, P., Estanislau, C., 2016. Modulation of grooming behavior in rats by different test situations. *Psychol. Neurosci.* 9. <https://doi.org/10.1037/pne0000038>

- Whiteford, H.A., Degenhardt, L., Rehm, J., Baxter, A.J., Ferrari, A.J., Erskine, H.E., Charlson, F.J., Norman, R.E., Flaxman, A.D., Johns, N., Burstein, R., Murray, C.J.L., Vos, T., 2013. Global burden of disease attributable to mental and substance use disorders: Findings from the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet* 382, 1575–1586. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)61611-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)61611-6)
- Zhang, C., Kalueff, A. V., Song, C., 2019. Minocycline ameliorates anxiety-related self-grooming behaviors and alters hippocampal neuroinflammation, GABA and serum cholesterol levels in female Sprague-Dawley rats subjected to chronic unpredictable mild stress. *Behav. Brain Res.* 363, 109–117. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2019.01.045>