



PRISCILLA KARLA FERNANDES LOPES

**ADMINISTRAÇÃO DE CUMARINA (4-METILDINAFETINA) E SEUS EFEITOS NA
ATIVIDADE FÍSICA VOLUNTÁRIA, COMPORTAMENTO E NEUROGÊNESE DE
CAMUNDONGOS**

**LAVRAS-MG
2019**

PRISCILLA KARLA FERNANDES LOPES

**ADMINISTRAÇÃO DE CUMARINA (4-METILDINAFETINA) E SEUS EFEITOS
NA ATIVIDADE FÍSICA VOLUNTÁRIA, COMPORTAMENTO E NEUROGÊNESE
DE CAMUNDONGOS**

Dissertação apresentada à banca de defesa como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Área de concentração em Alterações metabólicas, inflamação e alimentos funcionais, para obtenção do título de Mestre.

Prof. Dr. Rodrigo Ferreira de Moura
Orientador

Prof. Dr. Chrystian Araújo Pereira

Prof. Dr. Sérgio Scherrer Thomasi
Co-orientadores

LAVRAS-MG
2019

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Lopes, Priscilla Karla Fernandes.

Administração de cumarina (4-metildinafetina) e seus efeitos na atividade física voluntária, comportamento e neurogênese de camundongos / Priscilla Karla Fernandes Lopes. - 2019.

64 p. : il.

Orientador(a): Rodrigo Ferreira de Moura.

Coorientador(a): Chrystian Araújo Pereira, Sérgio Scherrer Thomasi.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Lavras, 2019.

Bibliografia.

1. Cumarinas. 2. Neurogênese. 3. Atividade física voluntária. I. de Moura, Rodrigo Ferreira. II. Pereira, Chrystian Araújo. III. Thomasi, Sérgio Scherrer. IV. Título.

PRISCILLA KARLA FERNANDES LOPES

**ADMINISTRAÇÃO DE CUMARINA (4-METILDINAFETIN) E SEUS EFEITOS NA
ATIVIDADE FÍSICA VOLUNTÁRIA, COMPORTAMENTO E NEUROGÊNESE DE
CAMUNDONGOS**

Dissertação apresentada à banca de defesa como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Área de concentração Alterações metabólicas, inflamação e alimentos funcionais, para obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 23 de abril de 2019

Prof. Dr. Rodrigo Ferreira de Moura (UFLA)

Prof^a. Dr^a. Aline Carvalho Pereira (UFLA)

Prof^a Dr^a. Lidiane Orlandi (UNILAVRAS)

Prof. Dr. Rodrigo Ferreira de Moura
Orientador

**LAVRAS-MG
2019**

*Ao Maick, meu amigo, amor e companheiro de todas as horas.
As minhas “meninas” Lucille e Paola por fazerem meus dias e noites melhores.
Aos meus pais por esse amor incontestável.
Aos meus irmãos, sobrinhos e amigos.
A todos os professores da minha vida, vocês sempre serão parte de tudo.*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Sem demagogia, agradeço a Deus pela capacitação, cuidado e amor mesmo sem merecimento.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) pela possibilidade de realização deste projeto.

Aos professores integrantes das bancas de qualificação e defesa pela generosidade em doar tempo e conhecimento para a construção desta dissertação.

Ao meu orientador e amigo, pessoa que respeito e admiro imensamente: Prof. Dr. Rodrigo Ferreira de Moura. Parte essencial do meu crescimento pessoal e profissional. Pessoa íntegra, humana e extremamente capacitada. Nunca prive do seu excelente trabalho a nossa já escassa selva acadêmica. T. Hanks!

Ao Prof. Dr. Sérgio Scherrer Thomasi, do Departamento de Química (UFLA) pela paciência e constantes ensinamentos.

Às fantásticas mulheres cientistas que desbravam valentemente esse mundo da pesquisa e as quais tive o prazer de conviver, admirar e espelhar: Natália Oliveira, Jéssica Petrini, Érika, Carol, Nayane, Janina, Flávia e Viviam Oliveira. À Isabela, pesquisadora, professora, amiga e primeira pessoa a incentivar esse caminho. E em especial, agradeço imensamente à amiga e brilhante pesquisadora Daiane Engel pelos ensinamentos, paciência, exemplo e por ser luz em minha mente.

Agradeço aos demais colegas do Programa em Ciências da Saúde: Luiz, Marco, Moisés e Márcio pela estrada partilhada.

Agradeço as pessoas que contribuíram para a viabilidade deste projeto em diferentes momentos: William (fisiologia), Isaac (histologia), Elmo (UFMG), Ana Elisa (estudante de medicina), Dirlene e Isabela (secretaria) e demais pessoas que a memória não colabora.

Agradeço também às pessoas que de alguma forma criaram obstáculos. Me fizeram mais forte.

Agradeço ao Prof. Dr. Lício Augusto Veloso e todos do LabSinCel (UNICAMP) onde pude realizar parte das análises e ter vivências técnicas de alto nível.

Agradeço a todos os professores e demais pesquisadores do LabDiMe (UNICAMP) pela oportunidade de conhecer e realizar novos sonhos e projetos.

Aos animais que involuntariamente doam suas vidas à pesquisa.

Agradeço aos familiares que partilham desta felicidade.

Aos meus irmãos, que na peculiaridade de cada um, torcem por mim. Patrick, Sérgio e Marcelo. Em especial minha irmã Patrícia Kássima, sempre amorosa e “admiradora” dos camundongos.

Aos meus sobrinhos e sobrinhas. Amo vocês infinitamente e sinto saudades a cada momento. Espero que se orgulhem de mim.

A minha sogra Ivone Maria e meu sogro José Alcântara fazerem de mim uma filha. Assim como minha cunhada Michele, meu cunhado Patrick e meu amigo de agregado, Wilson. Meus sobrinhos novos Aninha e João Pedro.

Aos meus pais, que mesmo na distância e saudade sempre estiveram, estão e estarão comigo. Também ao Tobias, meu pequeno irmão de coração.

As minhas meninas, Lucille e Paola. Vocês são luz do início ao fim do meu dia.

E não tenho palavras suficientes para agradecer ao meu amigo, amor e companheiro de todas as horas, Maick Alcântara. Nenhuma pessoa me ajudou tanto, me incentivou tanto e cuidou tanto quando mais precisei. Exemplo de amor, integridade, caráter e companheirismo. Você é meu “et al” preferido da vida. Amo vocês.

“Caos não é um abismo. Caos é uma escada. Muitos que a tentam escalar, falham e nunca mais tentam de novo. A queda quebra eles. E a alguns é dada a chance de subir, eles se agarram ao reino ou aos deuses ou ao amor. Apenas a escada é real. A escalada é tudo o que existe.”

Petyr Baelish (Game of Thrones)

RESUMO

Cumarinas são compostos orgânicos que pertencem a classe dos flavonoides, podendo ser sintetizadas ou de ocorrência natural. A 4-metildinafetina é uma cumarina sintetizada, precursora de derivados de 4-metil cumarina e tem suas atividades fisiológicas relacionadas com ação antioxidante, neuroprotetora e anti-inflamatória. O presente estudo buscou verificar os efeitos da administração oral da cumarina 4-metildafenetina em processos relacionados a atividade física voluntária, comportamento e neurogênese de camundongos C57BL6. Foram utilizados 32 camundongos, machos, isogênicos, com aproximadamente 8 semanas de idade. O experimento durou 30 dias e os animais foram separados em quatro grupos: SV (Sedentário Veículo), AFV (Atividade Física Veículo), SCum (Sedentário Cumarina), e AFCum (Atividade Física Cumarina). Os animais dos grupos AFCum e SCum receberam via gavagem uma dose diária (30 mg/kg) de 4-metildinafetina. Os grupos AFV e SV receberam apenas a solução veículo. Os grupos AFCum e AFV foram expostos a roda de atividade voluntária com registro em computador durante todo o experimento. Todos os animais receberam durante os 10 primeiros dias via intraperitoneal um marcador de proliferação celular Bromodeoxyuridina-BrdU (50mg/kg-2x/dia). Para avaliação de parâmetros comportamentais foram aplicados dois testes: Teste do Labirinto em Cruz Elevado (TLCE) relacionado à ansiedade e atividade locomotora e Teste de Reconhecimento de Objeto (TRO) para padrões de memória de reconhecimento. No 30º dia de experimento todos os animais foram anestesiados e eutanasiados para a coleta de tecidos. Após o processo de perfusão, o encéfalo foi coletado para análise de neurogênese através de imunofluorescência. Os dados foram analisados por meio de ANOVA ou teste t de Student para amostras independentes. A administração da 4-metildinafetina diminuiu o volume de atividade física voluntária no período diurno e minimizou o efeito de melhora do comportamento relacionado à ansiedade gerado pela atividade física voluntária. Não foram observadas diferenças na neurogênese, memória de reconhecimento e na velocidade/volume médio da atividade física voluntária relacionado à administração da 4-metildinafetina. Conclui-se que a atividade física melhora o comportamento relacionado à ansiedade e a atividade locomotora de camundongos expostos à roda de atividade física voluntária. A cumarina porém, influencia no comportamento e volume de atividade física relacionado ao período diurno, minimizando os efeitos comportamentais da atividade física voluntária.

Palavras chaves: 7,8-di-hidroxi-4-metilcumarina, proliferação neuronal, exercício voluntário, ansiedade, memória.

ABSTRACT

Coumarins are compounds that belong to the class of flavonoids, and can be synthesized or naturally occurring. 4-methyldinafetin is a synthesized coumarin, precursor of 4-methyl coumarin derivatives and has its physiological activities related to the antioxidant, neuroprotective and anti-inflammatory action. The present study aimed to verify the results of oral administration of coumarin 4-methyldaphenetine in processes related to voluntary physical activity, behavior and neurogenesis of C57BL6 mice. Thirty-two male, isogenic mice, approximately 8 weeks old, were used. The experiment lasted 30 days and the groups were separated into four groups: SV (Sedentary Vehicle), AFV (Physical Activity Vehicle), SCum (Sedentary Coumarin) and AFCum (Physical Activity Coumarin). Animals of the AFCum and SCum groups received a daily dose (30 mg/kg/wt) of 4-methyldinafetin via gavage. Groups AFV and SV only offer a vehicle solution. The AFCum and AFV groups were exposed to a volunteer activity wheel with computer registration throughout the experiment. All animals were screened intraperitoneally for 10 days on a bromodeoxyuridine-BrdU cell proliferation marker (50mg/kg-2x/day). Two tests were used to evaluate behavior patterns: Elevated Plus Maze Test (EPMT) and locomotor analysis and Object Recognition Test (ORT) for recognition memory patterns. On the 30th day of the experiment, all animals were anesthetized and euthanized for tissue collection. After the perfusion process, the brain was collected for neurogenesis analysis by immunofluorescence. Data were analyzed by means of ANOVA or Student's t-test for independent samples. The administration of 4-methyldinafetin decreased the volume of voluntary physical activity in the daytime period and minimized the effect of improvement in anxiety-related behavior generated by voluntary physical activity. No differences were observed in neurogenesis, recognition memory and the mean velocity / volume of voluntary physical activity related to the administration of 4-methyldinafetin. It was concluded that physical activity improves the behavior related to anxiety and the locomotor activity of mice exposed to the wheel of voluntary physical activity. Coumarin, however, influences the behavior and volume of physical activity related to the diurnal period, minimizing the behavioral effects of voluntary physical activity.

Keywords: 7,8-dihydroxy-4-methylcoumarin, neuronal proliferation, voluntary exercise, anxiety, memory.

LISTA DE FIGURAS

PRIMEIRA PARTE

Figura 1. Estrutura química da cumarina (2H-1-benzopiran-2-ona) e a identificação dos sítios conformacionais.....	14
Figura 2. Estrutura química básica da cumarina com especificação de radical e localização das variações estruturais.....	17
Figura 3. Estrutura química básica da furocumarina com especificação de radical e localização das variações estruturais.....	17
Figura 4. Estrutura química da 4-metildinafetina.....	19
Figura 5. Células neurais e expansão celular no associadas ao hipocampo.....	21
Figura 6. Localização e perfil de neurogênese no hipocampo e hipotálamo de camundongos.....	24
Figura 7. Roda de atividade física voluntária e método de registro de dados.....	28
Figura 8. Visão vertical/superior da estrutura do labirinto em cruz elevado.....	30
Figura 9. Visão frontal da estrutura do teste de reconhecimento de objeto.....	32

SEGUNDA PARTE

Figura 1. Delineamento experimental.....	44
Figura 2. Volume diário de atividade física voluntária.....	48
Figura 3. Volume total de atividade física voluntária.....	49
Figura 4. Velocidade média no período.....	50
Figura 5. Velocidade média final.....	51
Figura 6. Número de entradas e tempo de permanência nos Braços Abertos (BA) do TCLE.....	52
Figura 7. Número de entradas total (Braços Abertos + Braços Fechados), correspondente ao Índice de Locomoção (IL).....	52
Figura 8. Tempo de latência para reconhecimento do novo objeto.....	52
Figura 9. Proliferação celular e neurogênese geral.....	53

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AFCum	Atividade Física Cumarina
AFV	Atividade Física Veículo
BDNF	Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro
BA	Braços Abertos
BF	Braços Fechados
BO	Bulbo Olfatório
BrdU	5-bromo-2-desoxiuridina
CNTF	Fator Neurotrófico Ciliar
DCX	Doublecortin
DNA	Ácido Desoxirribonucleico (Deoxyribonucleic Acid)
FGF/2	Fator de Crescimento de Fibroblasto Básico
FMR	Fluxo Migratório Rostral
GABA	Ácido Gama-aminobutírico
GD	Giro Denteado
GDNF	Fator Neurotrófico Derivado da Glia
HCL	Ácido Clorídrico
IL	Índice de Locomoção
LCE	Labirinto em Cruz Elevado
LPS	Lipopolissacarídeo
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	Tampão Fosfato Salina
PFA	Solução de Paraformaldeído
POMC	Neurônios tipo pró-opiomelanocortina
SNC	Sistema Nervoso Central
SCum	Sedentário Cumarina
SV	Sedentário Veículo
TLCE	Teste Labirinto em Cruz Elevado
TRO	Teste de Reconhecimento de Objeto
ZSG	Zona Subgranular
ZSV	Zona Subventricular

SUMÁRIO

PRIMEIRA PARTE	13
1. INTRODUÇÃO	13
2. REFERENCIAL TEÓRICO	15
2.1. Metabolismo das cumarinas	19
2.2. Síntese de cumarinas	19
2.3. 4-metildinafetina	20
2.4. Neurogênese - Hipocampo e Hipotálamo	21
2.4.1. Estímulos envolvidos na neurogênese	25
2.5. Atividade física	26
2.6. Aspectos comportamentais	29
2.7. Memória de reconhecimento	32
3. JUSTIFICATIVA	33
4. OBJETIVOS	34
4.1. Objetivo geral	34
4.2. Objetivos específicos	34
5. REFERÊNCIAS	35
6. ARTIGO	42
7. CONCLUSÃO	60
8. REFERÊNCIAS	61

PRIMEIRA PARTE

1. INTRODUÇÃO

As cumarinas são polifenóis que constituem uma vasta e importante classe de compostos heterocíclicos de oxigênio, inicialmente encontradas como metabólitos secundários de plantas. São conhecidas também como benzopirona, que tem como característica estrutural um anel de benzeno ligado a um anel de pirona. Essa particularidade caracteriza o núcleo cíclico com seis diferentes opções de campos para rearranjos de substituintes estruturais, o que possibilita uma variedade de moléculas secundárias que manifestam importantes atividades biológicas e benefícios fisiológicos (KATSORI; HADJIPAVLOU-LITINA, 2014) como atividade anticoagulante, antifúngica, anti-inflamatória, antitumoral, hepato protetora, antioxidante (PÉREZ-CRUZ et al., 2018) e atividade neuroprotetora (SONG, Y. et al., 2017; VINAYAGAM; XU, 2017; ZENG et al., 2015). Possuem elevada biodisponibilidade, baixo peso molecular e processos simples para síntese (WU et al., 2009).

A 4-metildinafetina (7,8-di-hidroxi-4-metilcumarina) é uma cumarina sintetizada por processos relativamente simples, com baixo custo e bons rendimentos, como o Método Pechmann. Este método envolve basicamente a condensação de fenóis com ésteres β -cetônicos na presença de agentes condensantes ácidos (POTDAR; MOHILE; SALUNKHE, 2001). A 4-metildinafetina faz parte da família de derivados de 4-metil cumarina, o que lhe confere algumas atividades relacionadas com esse grupo de compostos, como anti-inflamatória e antioxidante. *In vitro*, observou-se ação antioxidante em células do hipocampo (JIN et al., 2015) e melhora em processos relacionados com a homeostase de elementos envolvidos na progressão de doenças neurodegenerativas (AGUIRRE et al., 2017). Em um modelo de peroxidação lipídica em isolado microssomal, a 4-metildinafetina induziu uma inibição considerável da peroxidação lipídica por inibição de espécies reativas de oxigênio (TYAGI et al., 2005). Em cultura de células leucêmicas humanas, induziu apoptose seletiva de modo dose-dependente (RIVEIRO et al., 2008).

Substâncias com atividade anti-inflamatória e antioxidante podem ter ação protetora e atuar como fator de melhora na sobrevivência para as células do sistema nervoso central (SNC), protegendo os neurônios e promovendo condições favoráveis para expansão neuronal (GAO, Z. et al., 2014). O processo de geração de novos neurônios a partir de precursores é conhecido como neurogênese e ocorre em áreas específicas do cérebro (SPALDING et al., 2013) sendo dependente de estímulos que ocorrem de maneira controlada por uma série de mecanismos

(HAGG, 2005). Dentre os estímulos endógenos e exógenos, destacam-se o ambiente intra e extracelular enriquecido, atividade física e aprendizagem (ANACKER; HEN, 2017).

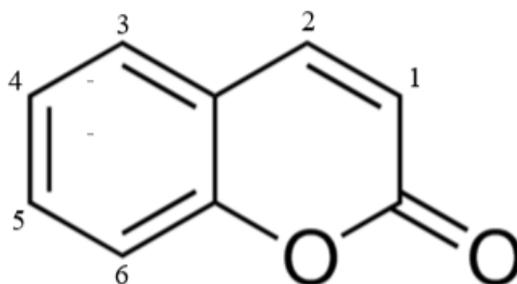
O consumo de determinados nutrientes e a atividade física promovem estímulos importantes na indução da neurogênese. A atividade física recebeu atenção especial nos últimos anos sendo considerada um importante indutor de neurogênese. Na região do hipocampo a relevância funcional da neurogênese se estende desde melhoras no aspecto cognitivo até proteção contra doenças neurodegenerativas (YAU et al., 2014). No hipotálamo a geração de novos neurônios na camada endimária do terceiro ventrículo contribuem para diversos mecanismos neurorreguladores (NIWA et al., 2016). O núcleo ventromedial do hipotálamo (VMH) é uma importante região do SNC para regulação de diversos processos, incluindo a ingestão de alimentos, gasto energético e metabolismo de macronutrientes (FUJIKAWA et al., 2017). Além disso, alimentação adequada em quantidade e qualidade juntamente com o exercício podem ser considerados como um dos mais promissores métodos não farmacológicos, não invasivos e com melhor custo-benefício para promoção da saúde, inclusive melhora de aspectos cognitivos como transtornos de ansiedade (LACHMAN et al., 2018).

Neste sentido, torna-se importante investigar substâncias que possam vir a atuar de modo favorável à neurogênese, uma vez que essa está relacionada com a melhora de aspectos fisiológicos, cognitivos e proteção contra processos neurodegenerativos. Conciliar essa investigação com respostas induzidas também pela atividade física poderia elucidar futuramente mecanismos e respostas sinérgicas ou independentes.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

Cumarinas são moléculas heterocíclicas de oxigênio de origem natural ou sintetizadas (KATSORI; HADJIPAVLOU-LITINA, 2014). A primeira cumarina (2H-1-benzopiran-2-ona) identificada é um composto incolor e perfumado que foi isolada em 1920 de uma espécie de feijão conhecida como Tonka (*Dipteryx odorata*, família *Fabaceae*), recebendo esse nome devido ao termo francês *coumarou*, que é utilizado para denominar as favas da família tonka (SARKER; NAHAR, 2017). Pode também ser classificada como uma benzopirona, pois pertence a uma classe de compostos que tem como característica química a presença de um anel de benzeno atrelado a um anel de pirona. O núcleo cíclico possui seis diferentes opções de rearranjos de substituintes estruturais, tendo algumas posições bastante exploradas para avaliar atividade funcional (Figura 1) (KAUR et al., 2015). Mais de 1300 cumarinas já foram identificadas e muitas outras tem sido estruturadas a partir do esqueleto base (HOULT; PAYÁ, 1996).

Figura 1 - Estrutura química da cumarina (2H-1-benzopiran-2-ona) e a identificação dos sítios conformacionais.



Os derivados sintéticos podem ser classificados como cumarinas mono-substituídas, di-substituídas, poli-substituídas e fundidas (KAUR et al., 2015). O fato de sua conformação estrutural possibilitar uma grande variedade de moléculas secundárias faz com que as cumarinas sejam amplamente utilizadas em diversos segmentos. Trabalhos envolvendo o anel central da cumarina tem sido desenvolvidos com uma enorme quantidade de atividades já relatadas (DETSI; KONTOGIORGIS; HADJIPAVLOU-LITINA, 2017), tais como antifúngica (KHAN et al., 2004), antiparasitária (MISRA et al., 2015), antiviral (NEYTS et al., 2009) e antibacteriana (FERREIRA et al., 2015). Sua estrutura mais simples, por exemplo, por apresentar aroma semelhante ao da baunilha tem sido utilizada pela indústria perfumista na fabricação de fragrâncias e essências (KATSORI; HADJIPAVLOU-LITINA, 2014).

Importantes produtos farmacêuticos também têm sido desenvolvidos, como os derivados cumarínicos que são empregados como agentes anticoagulantes devido à sua semelhança com a estrutura química da vitamina K. A varfarina é um clássico exemplo de cumarina com ação antitrombótica atualmente utilizada como base para fármacos (KATSORI; HADJIPAVLOU-LITINA, 2014). Nos últimos anos, algumas cumarinas também tem sido relacionadas positivamente em várias doenças não transmissíveis, incluindo obesidade, diabetes, insuficiência cardiovascular, insuficiência renal, câncer e distúrbios neurológicos (KADAKOL et al., 2016).

Dentre as cumarinas já estudadas, a esculetina (HEMSHEKHAR et al., 2013) e a ostole (LI, R. et al., 2017) apresentaram ação antioxidante e anti-inflamatória. Em um experimento utilizando modelo animal de acidente vascular isquêmico, a administração da cumarina ostole diminuiu o volume da área afetada pelo infarto e reduziu indicadores de inflamação (CHAO et al., 2010). A ostole demonstrou função neuroprotetora, através da modulação do ambiente de sobrevivência para as células neuronais, protegendo as bainhas de mielina, melhorando a atividade de remielinação e a expansão neuronal, promovendo de forma mais efetiva a recuperação anatômica e funcional a partir de déficits neurológicos (GAO et al., 2014).

Doses de 25mg/kg da cumarina esculetina melhoraram a cognição e a função motora relacionada a idade em camundongos de 17 e 22 semanas (MARTÍN-ARAGÓN; VILLAR; BENEDÍ, 2016). Em outro achado, a esculetina reduziu uma condição inflamatória no SNC de camundongos, diminuindo citocinas pró-inflamatórias e controlando comportamento ansioso, mensurado através do teste de labirinto em cruz elevado e teste de campo aberto. Embora a inflamação controlada possa atuar como um mecanismo protetor, a inflamação crônica pode gerar danos e disfunções fisiológicas. No SNC esse processo inflamatório crônico pode levar a sérias lesões nos neurônios das quais são comumente observadas em alguns processos neurodegenerativos, além de criar um ambiente desfavorável para proliferação celular (SULAKHIYA et al., 2016).

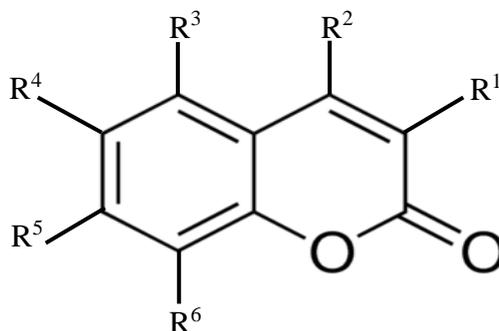
A umbeliferona é uma cumarina que tem sido relacionada à diversos efeitos fisiológicos, como controle glicêmico em modelo de diabete (LI, H.; YAO; LI, 2017), atividade anticancerígena através da indução da apoptose e controle do ciclo celular de células de carcinoma hepatocelular em ensaios *in vitro* (YU; HU; ZHANG, 2015). A administração de doses de 15 e 30 mg/kg de umbeliferona modularam positivamente comportamentos relacionados à ansiedade em animais de estresse, submetidos a diferentes testes comportamentais (QIN et al., 2017). Outra cumarina, a escopoletina também foi relacionada

com parâmetros fisiológicos e cognitivos. Em camundongos com acúmulo de lipídios hepáticos induzidos por dieta hiperlipídica e álcool, a escopoletina reduziu parâmetros como acetaldeído plasmático, colesterol total, níveis de triglicérides, insulina, gordura hepática e níveis de glicose sérica em jejum (LEE, H.-I. et al., 2014). Utilizando o teste de suspensão da cauda e teste de natação forçada, 100mg/kg de escopoletina via oral promoveu efeitos antidepressivos em camundongos (CAPRA et al., 2010).

Cumarinas têm sido relacionadas com neuroproteção e neurogênese. Cumarinas derivadas de furocumarinas, como a decursinol e a decursina apresentaram efeito protetor contra neurotoxicidade induzida pelo glutamato em células neurais e células da glia de ratos saudáveis (KANG; KIM, 2007). A cumarina nodakenina elevou a proliferação neurogênica e melhorou a função cognitiva em camundongos, observados através de imuno-coloração de 5-bromo-2-desoxiuridina (BrdU) e testes comportamentais (GAO, Q. et al., 2015). A cumarina fraxetina apresentou atividade neuroprotetora através da redução da geração de radicais livres e controle de apoptose neuronal induzida por roterona. A roterona é um inibidor do complexo I mitocondrial que induz a apoptose através do aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (MOLINAJIMENEZ et al., 2005).

Assim, a atividade das cumarinas no SNC demonstram ter efeitos fisiológicos importantes e suas propriedades físico-químicas, tamanho e arquitetura molecular podem definir a seletividade e extensão da atividade biológica. A substituição do grupo funcional, além de poder ser induzida sinteticamente em cada um dos locais disponíveis, representa uma interessante descoberta para explorar efeitos funcionais de novas substâncias (SKALICKA-WOŹNIAK et al., 2016). Algumas variações estruturais podem ser observadas na Figura 2, com especificação no Quadro 1, na Figura 3 com especificação no Quadro 2:

Figura 2 - Estrutura química básica da cumarina com especificação de radical e localização das variações estruturais.

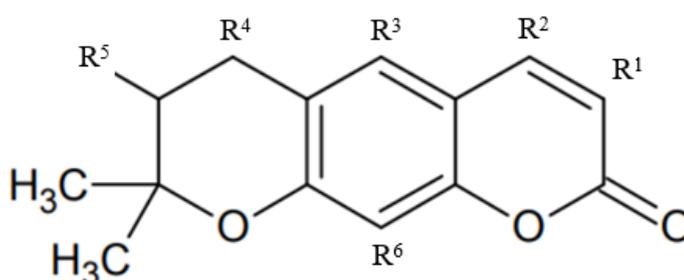


Quadro 1 - Especificação das variações estruturais das cumarinas citadas no texto segundo apresentação da Figura 2:

<i>Cumarina</i>	<i>Localização da variação estrutural através dos radicais</i>					
	R¹	R²	R³	R⁴	R⁵	R⁶
Cumarina	H	H	H	H	H	H
Ostole	H	H	H	H	OCH ₃	CH ₂ CH=C(CH ₃) ₂
Esculetina	H	H	H	OH	OH	H
Umbeliferona	H	H	H	H	OH	H
Escopoletina	H	H	H	OCH ₃	H	H
Fraxetina	H	H	H	OCH ₃	OH	OH

Fonte: adaptado de Skalicka-Wozniak et al. (2016)

Figura 3 - Estrutura química básica da furocumarina com especificação de radical e localização das variações estruturais.



Quadro 2 - Especificação das variações estruturais das furocumarinas citadas no texto segundo apresentação da Figura 3:

<i>Cumarina</i>	<i>Localização da variação estrutural através dos radicais</i>					
	R¹	R²	R³	R⁴	R⁵	R⁶
Decursinol	H	H	H	H	OH	H
Decursina	H	H	H	H	OCOCHC(CH ₃) ₂	H

Fonte: adaptado de Skalicka-Wozniak et al. (2016)

2.1. Metabolismo das cumarinas

Após a administração oral, as cumarinas tendem a serem rapidamente absorvidas pelo trato gastrointestinal e bem distribuídas pelo organismo. Na via mais estudada, a cumarina é metabolizada à 7-hidroxicumarina no fígado pelo sistema oxidativo. A 7-hidroilação é a via principal para o metabolismo das cumarinas e a isoforma do citocromo P450 responsável pela hidroilação é o citocromo P450 2A6 (LAKE, 1999). A ruptura estrutural da cumarina pode ocorrer em qualquer uma das seis posições de sua estrutura, porém inicialmente ocorre a abertura do anel lactona, resultando em vários metabólitos como o-hidroxifeniletanol, o ácido o-hidroxifenilacético, o-hidroxifenilacetaldeído, o ácido o-hidroxifenilático, além de outros com menor expressão (YUN; SHIMADA; GUENGERICH, 1991).

A meia vida para eliminação das cumarinas é por volta de uma a duas horas em humanos e entre uma e quatro horas em outras espécies (camundongos, ratos, hamster siberiano, coelho, babuíno). Embora, na maioria das espécies a rota de excreção seja a urina, excreção biliar pode ocorrer em ratos, resultando na presença de metabólitos cumarínicos nas fezes (LAKE, 1999).

2.2. Síntese de cumarinas

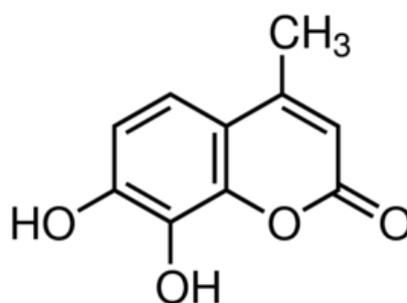
Devido às características funcionais das cumarinas, a busca por procedimentos para a síntese desses compostos tem sido frequente no campo da química. Vários métodos podem ser utilizados na síntese das cumarinas, tais como o Perkin, Wittig, Knoevenagel, Reações de Reformatsky e a Reação de Pechmann, sendo esta última considerada uma das mais promissoras e importantes (SHARMA; KUMAR; MAKRANDI, 2011). A reação de Pechmann para síntese de cumarinas foi relatada pela primeira vez em 1883, por Pechmann e Duisberg. É uma síntese promovida por ácido de derivados de cumarinas a partir da condensação de fenóis, orto-ésteres ou ácidos carboxílicos que em condições ácidas, envolve uma esterificação ou transesterificação, seguida por uma ciclização e desidratação. Essa reação também pode ser denominada como ciclização Pechmann, condensação de cumarinas Pechmann, ciclocondensação de cumarinas Pechmann, ou a síntese Pechmann (WANG., 2010).

Esse método possibilita o uso de materiais e métodos de partida simples, possui ampla variedade de agentes condensantes possíveis de serem utilizados e pode ser realizada sem a necessidade de manipulação da temperatura ambiente. Possibilita assim, a manipulação de diversas variações estruturais das cumarinas facilitando a exploração de suas funcionalidades (SHARMA; KUMAR; MAKRANDI, 2011).

2.3. 4-metildinafetina

A 4-metildafenetina (fórmula molecular: $C_{10}H_8O_4$; nome IUPAC: 7,8-di-hidroxi-4-metilcromeno-2-ona; sinônimo na literatura científica: 7,8-di-hidroxi-4-metilcumarina; peso molar: 192.17 g/mol) é uma cumarina de origem sintética sendo uma das precursoras na síntese de derivados de 4-metilcumarina (JIN et al., 2015). Pode ser considerada como uma cumarina simples, uma vez que a substituição estrutural ocorre apenas no anel benzeno utilizando radicais hidroxila (Figura 4) (WU et al., 2009).

Figura 4 - Estrutura química da 4-metildinafetina.



In vitro esta cumarina apontou ação antioxidante com propriedades sequestradoras de radicais livres e proteção contra a toxicidade do excesso de glutamato em células HT-22 do hipocampo (JIN et al., 2015). Em um modelo microsomal isolado de fígados de ratos a 4-metildafenetina provocou uma inibição considerável da peroxidação lipídica, superior inclusive a um dos já estabelecidos antioxidantes fenólicos padrões, o α -tocoferol (TYAGI et al., 2005). Efeito semelhante também foi observado utilizando micróglia de ratos sob inflamação induzida por lipopolissacarídeo (LPS). Achados interessantes, uma vez que o processo inflamatório pode representar um importante fator para progressão de desordens neurodegenerativas (TOGNA et al., 2014).

Em outro estudo recente, a mesma cumarina foi relacionada com melhora da homeostase do ferro em modelos *in vitro* e *in vivo*. A desregulação da homeostase do ferro no SNC está diretamente associada à disfunção mitocondrial, que desempenha um papel importante na progressão de doenças neurodegenerativas comuns, como a doença de Parkinson (AGUIRRE et al., 2017). A 4-metildinafetina também induziu apoptose seletiva e dependente de concentração em cultura de células leucêmicas humanas. Os ensaios *in vitro* demonstraram que as células leucêmicas tratadas com a cumarina apresentaram, de modo dose-dependente, alterações morfológicas típicas associadas ao processo apoptótico, como fragmentação do ácido desoxirribonucleico (DNA), com encolhimento celular, condensação da cromatina (picnose) e

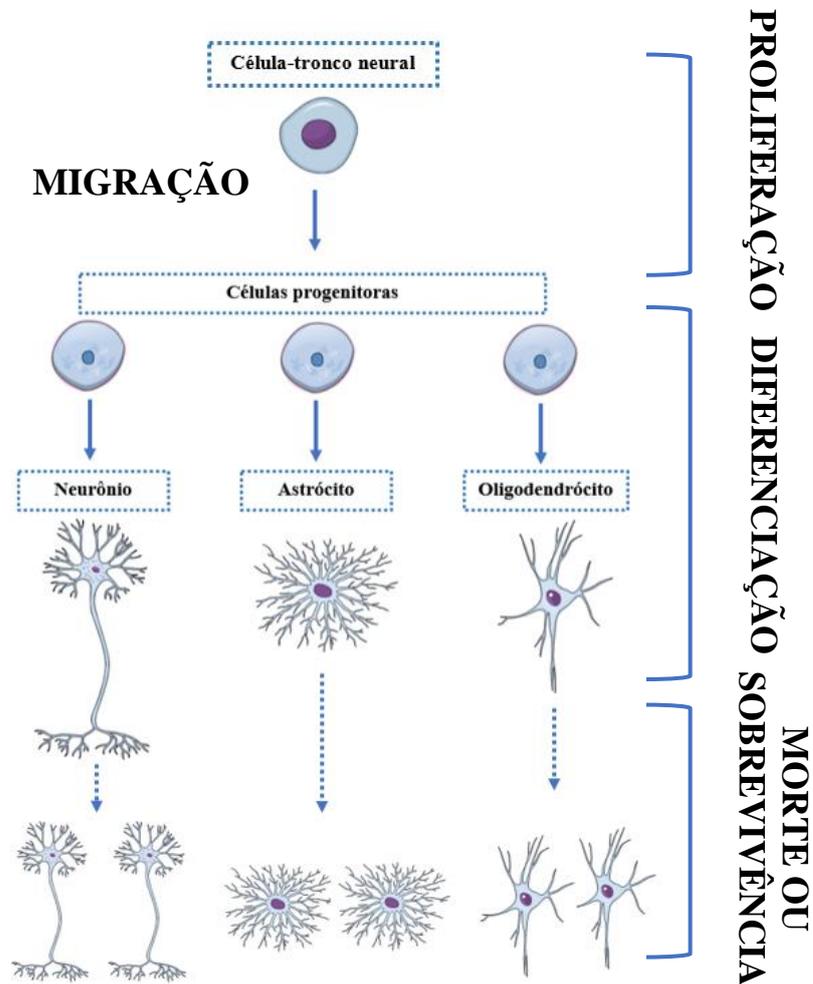
segmentação nuclear. Os autores sugerem que os grupos hidroxilos adjacentes no núcleo cumarina podem atuar como o fator mais importante envolvido na atividade pró-apoptótica em células leucêmicas (RIVEIRO et al., 2008).

2.4. Neurogênese - Hipocampo e Hipotálamo

A primeira evidência de proliferação celular no SNC adulto foi relatada em meados de 1965 com a publicação do resultado de uma série de experimentos realizados por Joseph Altman e Gopal Das, que observaram a proliferação de células no giro denteado de ratos adultos utilizando técnicas histológicas com marcador H-timidina (ALTMAN; DAS, 1965). Porém, foi apenas após o aprimoramento de técnicas utilizando a bromodeoxiuridina no início dos anos 1990 que foi possível o verdadeiro avanço dos estudos da neurogênese. A técnica consiste na administração do composto análogo da timidina, o BrdU, que se fixa ao DNA de células em proliferação. Os novos neurônios podem ser visualizados usando imunofluorescência em conjunto com outros marcadores para verificar a identidade neuronal dessas novas células (GOULD, 2007).

A neurogênese pode então ser definida como um processo no qual há geração de neurônios funcionais a partir de precursores em áreas específicas do SNC. Estima-se que ocorra a formação de aproximadamente 700 novos neurônios por dia, o que corresponde a uma taxa de renovação de 1,75% durante o ano (SPALDING et al., 2013). De maneira geral, acontece a partir de células tronco-neurais. Essas células tem como características uma capacidade elevada de proliferação, auto renovação e multipotencialidade em diferenciação, ou seja, podem dar origem a fenótipos celulares distintos como neurônios, astrócitos e oligodendrócitos (GAGE, 2000). Inicialmente, as células tronco neurais dão origem às células progenitoras, em uma fase conhecida como proliferação. Posteriormente, as células progenitoras assumem identidade de alguma célula neuronal específica conhecida, caracterizando a fase de diferenciação. Após isso, diversos fatores vão determinar a capacidade de sobrevivência ou morte de cada célula (Figura 5) (TAUPIN, 2006).

Figura 5 - Células neurais e expansão celular no associadas ao hipocampo.



Fonte: Adaptado de Taupin (2006).

Várias áreas têm sido relacionadas com a neurogênese, sendo a zona subventricular (ZSV) e a zona subgranular (ZSG) no giro denteado (GD) do hipocampo as mais estudadas. A primeira, contribui com novos neurônios para o bulbo olfatório (BO) e a segunda produz células excitatórias relacionadas a própria região do hipocampo (ANACKER; HEN, 2017). Porém, áreas como a amígdala, neocórtex, tubérculo olfativo, substância negra, troco cerebral, medula espinhal, córtex piriforme e hipotálamo tem demonstrado recentemente a capacidade de geração de novos neurônios (GOULD, 2007).

No hipocampo a neurogênese adulta tem atraído particular interesse devido as funções atribuídas à essa área. O potencial de processamento das informações no lobo temporal medial está relacionado com muitas formas de aprendizado, memória e com a fisiopatologia de

diversos distúrbios neurológicos (CHRISTIAN; SONG; MING, 2014). Além do envolvimento em funções cognitivas, o hipocampo é considerado uma importante estrutura nas atividades do chamado cérebro emocional, modulando diversas respostas de estados afetivos e particularmente envolvido com a modulação de estados de ansiedade (KIM; JEON, 2018).

Inclusive, algumas regiões do hipocampo se tornaram alvos de diversos antidepressivos e ansiolíticos que visam modular os efeitos fisiológicos nessa região afim de otimizar o controle dos transtornos relacionados à ansiedade (SANTARELLI et al., 2003). Esta área também se destaca como um alvo promissor na pesquisa para doenças mentais, uma vez que está associado ao fato de ser sensível à estímulos relacionados a plasticidade neuronal ao longo de toda a vida e sensível a mudanças ambientais (SCHOENFELD; CAMERON, 2015). Entretanto, é necessário ainda elucidar se a proporção do aumento da população de células neuronais seria realmente suficiente para influenciar nas alterações fisiológicas (HILL; SAHAY; HEN, 2015).

A neurogênese assume determinadas peculiaridades funcionais nas diferentes áreas do SNC. Por exemplo, na ZSG são encontradas células progenitoras adultas do GD ou célula radial tipo 1 que dão origem as células progenitoras intermediárias, ou células tipo II. Essas progenitoras amadurecem a nível local e dão origem neurônios granulares do giro denteado que contribuem para funções cognitivas e funções relacionadas ao comportamento emocional. Na ZSV, os astrócitos que revestem a camada entre o ventrículo lateral e o estriado atuam como células-tronco neurais de divisão lenta, mas com capacidade de gerar precursores de neuroblastos. Após passar pelas fases de células tipo 1 e células tipo 2, estes neuroblastos são direcionados ao BO através de um caminho conhecido como Fluxo Migratório Rostral (FMR). Após essa migração, as células adultas da ZSV amadurecem em dois tipos principais de interneurônios, conhecidos como células granulares e as células periglomerulares, que exercem funções modulatórias e de processamento de informações sensoriais na própria região (LLEDO; ALONSO; GRUBB, 2006; VARELA-NALLAR; INESTROSA, 2013).

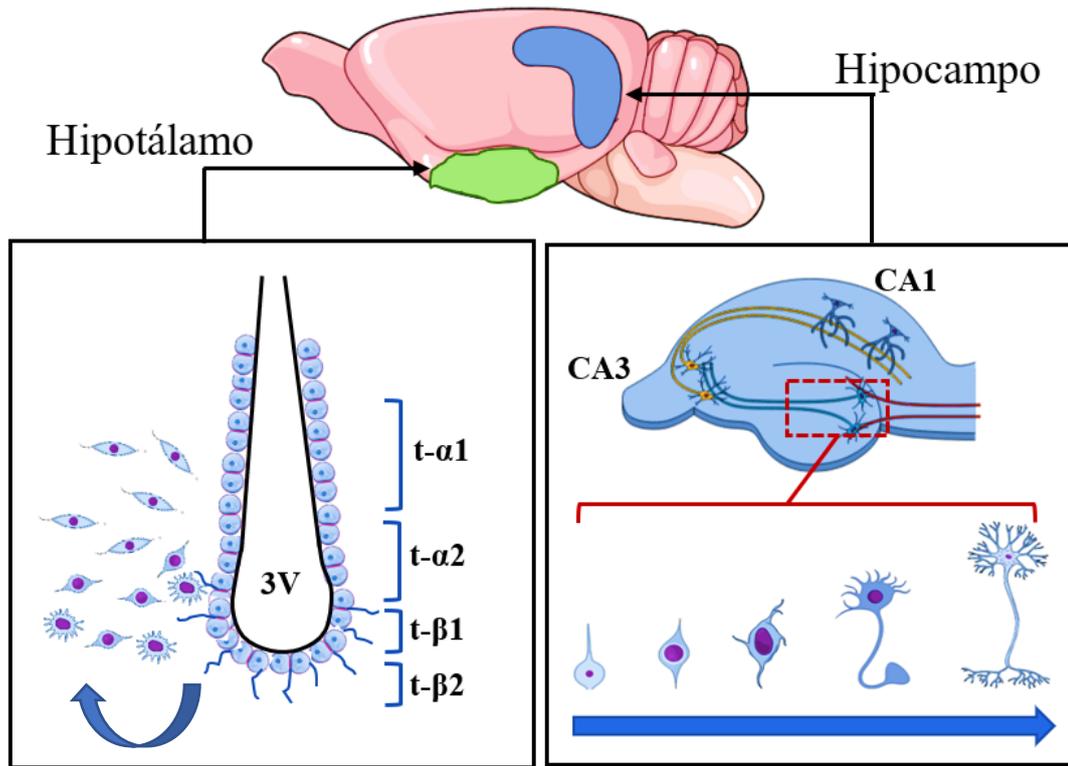
Embora com um nível aparentemente menor em comparação com as regiões hipocampais, a neurogênese hipotalâmica também apresenta questões importantes, uma vez consideradas as funções referentes a esta região do SNC. O hipotálamo é uma estrutura cerebral localizada na base do diencefalo, em contato com a eminência mediana e próxima ao terceiro ventrículo. (RECABAL; CAPRILE; GARCÍA-ROBLES, 2017). Representa uma estrutura chave no controle de várias e importantes funções fisiológicas, sendo regulador homeostático central de muitos processos fisiológicos, incluindo sono, ritmos circadianos, temperatura corporal central, pressão arterial, sede e equilíbrio da ingestão alimentar (MIGAUD;

BUTRILLE; BATAILLER, 2015) e assim como no hipocampo, a neurogênese no hipotálamo é dependente de alguns fatores e regulada por condições ambientais, comportamentais e hormonais (LEE, D. A. et al., 2012).

Três zonas proliferativas têm sido relatadas e postuladas como possíveis nichos neurogênicos no hipotálamo. A primeira, localizada no parênquima hipotalâmico adjacente, as tanicitos dão origem a neurônios e possivelmente astrócitos. Uma segunda região, mais dorsal, induz proliferação em tanicitos $\alpha 2$. Estas tanicitos $\alpha 2$ tem capacidade de auto-renovação, o que pode dar origem a outros subtipos de células tanicitos, como as β -tanicitos. Elas também se dividem assimetricamente para dar origem a neurônios, astrócitos e, mais raramente, oligodendrócitos. Na terceira região, localizada na eminência mediana, as tanicitos dividem-se simetricamente e dão origem a neurônios, bem como possivelmente progenitores oligodendrócitos e outros tipos celulares não caracterizados (YOO; BLACKSHAW, 2018).

Tanicitos mantem contato direto com o líquido cefalorraquidiano e compartilham as mesmas características morfológicas dos precursores neuronais da ZSV e da ZSG, fazendo com que essas células sejam apontadas como possíveis células progenitoras multipotenciais, o que permitiria um processo neurogênico contínuo (NIWA et al., 2016). São classificadas em quatro grupos principais de acordo com a sua localização e expressão gênica, tanicito $\alpha 1$, tanicito $\alpha 2$, tanicito $\beta 1$ e tanicito $\beta 2$. A localização dessas células faz com que elas tenham contatos com neurônios específicos e funcionem como células neuromoduladoras (RECABAL; CAPRILE; GARCÍA-ROBLES, 2017). Os diferentes perfis de neurogênese no hipotálamo e hipocampo podem ser visualizados de maneira sucinta na Figura 6:

Figura 6. Localização e perfil de neurogênese no hipocampo e hipotálamo de camundongos.



Legenda: t- α 1 (Tanicito α 1), t- α 2 (Tanicito α 2), t- β 1 (Tanicito β 1), t- β 2 (Tanicito β 2), 3V (Terceiro Ventrículo), CA1 (Região CA1 do hipocampo), CA2 (Região CA2 do hipocampo).
 Fonte: adaptado de Taylor, C. J., Jhaveri, D. J., Barlet, P. F., (2013); Miller, et al (2013).

2.4.1. Estímulos envolvidos na neurogênese

O processo neurogênico depende de vários estímulos e seus mecanismos moleculares ainda não foram totalmente elucidados. Esses estímulos são controlados de forma precisa pela interação de vários mecanismos de sinalização, além de moléculas de orientação que estão localizadas dentro de regiões específicas do SNC (HAGG, 2005). O ambiente intra e extracelular enriquecido, exercício físico e a aprendizagem podem atuar como estimuladores em várias fases da neurogênese. Dentre as quais, a proliferação das células tronco-neurais, a diferenciação dessas células em novos neurônios e a sobrevivência. De forma oposta, o estresse e o envelhecimento são apontados como possíveis inibidores, principalmente diminuindo a proliferação, modificando o direcionamento e reduzindo a sobrevivência dessas células (ANACKER; HEN, 2017).

Em roedores, alguns fatores de crescimento e fatores neurotróficos mostraram capacidade de regular tanto a proliferação de progenitores neurais quanto as próprias células-tronco neurais (HAGG, 2005; PIERCE; XU, 2010). O fator de crescimento de fibroblasto

básico (FGF/2) exerce funcionalidade para a manutenção do pool de células do tronco neural. O fator neurotrófico ciliar (CNTF) demonstrou capacidade de auto-renovação de precursores neurais *in vitro* e neurogênese em camundongos adultos (HAGG, 2005). BDNF também tem mecanismos que favorecem a neurogênese do ZSG, não altera o processo na ZSV, mas é necessário para a migração do neuroblasto da ZSV ao longo dos vasos sanguíneos (BELLENCHI et al., 2013).

Neurotransmissores também podem influenciar na cascata de diferenciação celular que envolve a neurogênese. O ácido gama-aminobutírico (GABA) influencia na regulação de diferentes etapas da neurogênese adulta, incluindo a proliferação de progenitores neurais, migração e diferenciação de neuroblastos e integração sináptica de neurônios recém-nascidos (GE et al., 2007). Redução nos níveis de dopamina pode afetar diretamente a produção de novos neurônios na ZSV, uma vez que compreende uma das principais regiões inervadas por projeções dopaminérgicas. A quantidade de oxigênio fornecida às células é um importante elemento na regulação de diversos mecanismos no SNC, inclusive na neurogênese. Ambientes de hipóxia podem gerar alterações que promovam a auto-renovação, por estímulos de vias específicas (PARK; ENIKOLOPOV, 2010).

Dieta, citocinas reguladas pela dieta e atividade física tem sido destacadas como elementos importantes nos níveis de neurogênese hipotalâmica, possivelmente através de estímulo às células tanicitos (LEE, D. A. et al., 2012b). O consumo elevado de ácidos graxos poli-insaturados ômega-3 proporcionou aumento de neurônios tipo pró-opiomelanocortina (POMC) no hipotálamo em camundongos alimentados com dieta rica em gordura (NASCIMENTO et al., 2016). A atividade física voluntária também induziu o aumento da neurogênese no hipotálamo e no revestimento ependimário do terceiro ventrículo, além do aumento de níveis totais de proliferação celular (NIWA et al., 2016).

2.5. Atividade física

Atividade física pode ser definida como um movimento realizado pelo corpo e produzido pelos músculos esqueléticos com requerimento e gasto de energético. O exercício físico poderia ser considerado como uma subcategoria de uma atividade física que fosse planejada, estruturada, repetitiva e proposital no sentido de melhora ou condicionamento de um ou mais componentes, atrelados a um ou mais objetivos (ALLENDORFER; ARIDA, 2018). A OMS acrescenta que atividades como realização de trabalhos rotineiros, brincadeiras, tarefas domésticas, viagens e envolvimento em atividades recreativas são consideradas atividades

físicas e que o termo "atividade física" não deve ser confundido com "exercício". Alerta ainda para o fato que atualmente 1 em cada 4 adultos não está suficientemente ativo e que mais de 80% da população adolescente do mundo é insuficientemente ativa. Números preocupantes uma vez que o sedentarismo representa um dos principais fatores de risco de morte no mundo (WHO, 2018).

A atividade física é uma importante aliada na prevenção de doenças crônicas e contribuir de maneira positiva em outros aspectos da saúde, como melhora da qualidade de vida (ACREE et al., 2006; LANGLOIS et al., 2013), aumento da flexibilidade e força muscular (SECO et al., 2013), redução nos níveis de pressão arterial e colesterol (CESA et al., 2014) e melhora de diversos aspectos cognitivos (ANGEVAREN et al., 2008). Evidências corroboram a importância da atividade física na redução de sintomas relacionados a depressão, melhora do humor, aumento da capacidade de trabalho físico, mental e redução significativa da ansiedade e de sintomas depressivos (CHU et al., 2014). Embora a atividade física voluntária possa desempenhar efeito ansiolítico, alguns trabalhos ainda apontam resultados nulos ou contraditórios a esta análise. Enquanto alguns estudos apontam para a melhora do comportamento ansioso, atuando principalmente como mediador em mudanças no eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, outros autores não observaram os mesmos efeitos. Fazendo com que pesquisas sobre os mecanismos ainda sejam necessárias (FULK et al., 2004; FUSS et al., 2009; LALANZA et al., 2015).

Durante a gestação a prática regular de atividade física pode influenciar no desenvolvimento do cérebro do feto, repercutindo na melhora dos resultados de aprendizado, inteligência, compreensão de leitura, atenção, desempenho em diferentes tarefas e amplificação de circuitos neurais mais complexos (GOMES DA SILVA; ARIDA, 2015). Trabalhos apontam que a atividade física pode ser considerada um dos mais fortes indutores de neurogênese e sua relevância funcional pode se estender a melhoras no aspecto cognitivo, proteção contra doenças neurodegenerativas (FARMER et al., 2004; GARRETT et al., 2012; YAU et al., 2014), aumento de fatores neurotróficos, estímulo de precursores da neurogênese (GARRETT et al., 2012; GOMES DA SILVA; ARIDA, 2015) e melhora de funções cognitivas (FORDYCE; WEHNER, 1993). Dentre os mecanismos envolvidos, estaria a expressão aumentada dos fatores neurotróficos como BDNF e fator neurotrófico derivado da glia (GDNF), que colaboram para o aumento da plasticidade cerebral e conseqüentemente melhora de aspectos relacionados a memória e aprendizagem. Pode haver também a diminuição do estresse oxidativo e redução

da neuroinflamação dos gânglios da base, tornando o ambiente mais propício as atividades fisiológicas e funcionais dos neurônios (MURRAY et al., 2014).

A atividade física voluntária como indutora da neurogênese foi descrita pela primeira vez no final da década de 1990, Paarg, Van e colaboradores (1999) demonstraram que camundongos C57BL/6 de dois a quatro meses de exposição à roda de atividade física voluntária tiveram aumento expressivo de células granulares no GD. Os camundongos apresentaram melhora no desempenho em labirinto aquático, maior sobrevivência das células BrdU+ e aumento seletivo do potencial de longa duração no hipocampo. Esses resultados iniciaram a ideia de que a atividade física voluntária poderia contribuir para o aumento da camada de células granulares no hipocampo e que essas novas células poderiam auxiliar no desempenho de processos relacionados à aprendizagem e memória (PRAAG, VAN et al., 1999). Desde então, a roda de atividade física voluntária tem sido um modelo experimental frequentemente utilizado para trabalhos envolvendo mecanismos de indução da neurogênese (GARRETT et al., 2012).

Apesar de ocorrer em diferentes níveis, a atividade física voluntária através da roda de atividade pode estimular a neurogênese em diferentes linhagens de animais (MERRITT; RHODES, 2015). Diferentes períodos de exposição também demonstram resultados relacionados à neurogênese e melhora do ambiente no SNC. Camundongos expostos à roda de atividade física voluntária apresentaram proliferação de células no giro denteado após 14 dias, sobrevida elevada de células após 14 e 28 dias e a taxa de diferenciação e maturação dos neurônios recém-nascidos aumentada nos corredores de 28 dias em comparação aos controles (GARRETT et al., 2012). Aumento da neurogênese no hipocampo e aumento dos níveis de BDNF foram observados em camundongos expostos à roda de atividade por seis meses, com melhoras na retenção da memória espacial e melhora no desempenho no teste do *rota-rod* (MARLATT et al., 2012). Animais sedentários apresentaram até três vezes mais neurônios recém-nascidos quando submetidos à roda de atividade em um período de 7 a 12 dias, sendo capazes de correr até 5 km por noite (FARMER et al., 2004).

A roda de atividade física voluntária é um modelo experimental frequentemente utilizado para mensurar parâmetros a partir do desempenho físico e resistência, relacionado principalmente com fatores que possam atribuir melhorias à saúde. Em contraste com outros modelos experimentais que necessitam de estímulos aversivos para forçar o movimento ativo, a roda de atividade física voluntária permite que os animais corram livremente em um ambiente controlado, sem grandes interferências. O protocolo básico consiste em permitir que os animais,

acomodados em caixas individuais, tenham acesso livre a uma roda de atividade alocada dentro da caixa. As rotações são transmitidas eletronicamente e a taxa de execução é capturada por um software para armazenamento e análise de dados por períodos variáveis (GOH; LADIGES, 2015). O modelo utilizado pode ser visualizado na Figura 7:

Figura 7 - Roda de atividade física voluntária e método de registro de dados.



Fonte: arquivo pessoal do autor.

2.6. Aspectos comportamentais

A ansiedade está relacionada com um desenvolvimento excessivo do medo quando comparado a real ameaça para o estímulo em que situações reais não ameaçam a espécie (REVEST et al., 2009). Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), a ansiedade é um dos transtornos psiquiátricos que mais afetam a população mundial, com estimativa de 264 milhões de pessoas. O Brasil ocupa atualmente o primeiro lugar em prevalência de transtornos de ansiedade e o quinto lugar em índices de depressão (WHO, 2018).

É uma desordem complexa, multifatorial e que resulta de um conjunto de vários fatores de origem ambiental, psicológica e biológica (KIM; JEON, 2018) que vão desde genéticos como hereditariedade de genes de vulnerabilidade (DOMSCHKE; MARON, 2013) até composição da microbiota do trato gastrointestinal (FOSTER; RINAMAN; CRYAN, 2017; WANG, Y.; KASPER, 2014). Alterações de caráter fisiológico também estão relacionadas com o comportamento ansioso. Processos inflamatórios e estresse oxidativo, por exemplo, estão

diretamente envolvidos na fisiopatologia da ansiedade e depressão (SHAFIEE et al., 2018; SULAKHIYA et al., 2016). Indivíduos deprimidos com sintomas relacionados a ansiedade apresentaram níveis aumentados de citocinas pró-inflamatórias (FERREIRA MELLO et al., 2013).

A neuroinflamação influencia o comportamento ansioso desde os efeitos da produção exacerbada de citocinas pro-inflamatórias (FELGER, 2018; FERREIRA MELLO et al., 2013) até na diminuição de neurotransmissores importantes como a serotonina (KIM; JEON, 2018) e neurotrofinas como o BDNF (WANG, J. et al., 2016). Isso propicia um ambiente com estímulos desfavoráveis inclusive para neurogênese hipocampal, intensificando os prejuízos relacionados aos transtornos de ansiedade, uma vez estabelecida a relação entre neurogênese e as atividades das diferentes áreas do SNC. Em animais transgênicos previamente tratados para depleção da neurogênese no hipocampo, foi observado aumento considerável de ansiedade (REVEST et al., 2009).

Diante do constante aumento da prevalência de transtornos relacionados à ansiedade tem sido ampliada também a busca por tratamentos e substâncias com potencial efeito no tratamento desses transtornos. Vários fármacos são utilizados no tratamento clínico da ansiedade, mas o resultado do tratamento não é satisfatório devido à fatores como baixa eficácia, ação tardia, efeitos colaterais e baixa adesão do paciente a longo prazo (SULAKHIYA et al., 2016). Parte destes contrapontos se deve aos mecanismos pouco claros da doença, tornando necessária a busca por novas alternativas e compostos (GAYNES et al., 2009).

Algumas cumarinas apresentaram efeitos ansiolíticos em modelos experimentais. A esculetina por exemplo, foi capaz de atenuar mudanças comportamentais relacionadas à ansiedade em um modelo de inflamação induzido por LPS em animais submetidos ao teste de labirinto em cruz elevado (TLCE) (SULAKHIYA et al., 2016). Em uma revisão sobre os efeitos das cumarinas nas desordens do SNC, os autores identificaram que a imperatonina e a isoimperatonina demonstraram efeitos ansiolíticos significativos em roedores submetidos a diferentes modelos de testes comportamentais, e que a abordagem das cumarinas nesse sentido poderia trazer respostas promissoras (SKALICKA-WOŹNIAK et al., 2016).

Vários modelos experimentais tem sido utilizados para estudos comportamentais relacionados à ansiedade. Nas últimas décadas o TLCE tem sido amplamente explorado e se estabeleceu como um modelo clássico para avaliações de comportamento de roedores em laboratórios (HALLER; ALICKI, 2012). Foi desenvolvido inicialmente por Handley e Mithani

(1984) e posteriormente validado por Pellow e colaboradores (1985) com base psicológica, fisiológica e farmacológica (PELLOW, et al. 1985; HANDLEY; MITHANI, 1984).

O modelo ganhou destaque na comunidade científica e atualmente é considerado confiável para estudos da neurobiologia da ansiedade (HANDLEY; MITHANI, 1984; PELLOW et al., 1985). Pode ser considerado prático, de rápida aplicação e medição, uso e design simples, não requer de treinos prolongados, privações ao animal ou estímulos aversivos como choques (CAROBREZ; BERTOGLIO, 2005; RODGERS et al., 1997). Consiste em uma estrutura de madeira elevada a 50 cm acima do nível do chão, com quatro braços. Dois braços abertos (50 x10 cm) e dois braços fechados (50 x10x40cm), sendo estes opostos entre si e com o teto aberto (PELLOW et al., 1985). O modelo utilizado pode ser visualizado na Figura 8:

Figura 8 - Visão vertical/superior da estrutura do labirinto em cruz elevado.



Fonte: arquivo pessoal do autor.

No TLCE a mensuração do nível de ansiedade está relacionada com o número de entradas nos braços abertos e o tempo de permanência nos mesmos. Porém, além de análises relacionadas ao comportamento ansioso dos animais, o TLCE também possibilita extrair dados paralelos, como a atividade locomotora, que é caracterizada pelo número de entradas totais (total de entradas = entrada nos braços abertos + entrada nos braços fechados) (PELLOW et al., 1985).

Já a locomoção, pode ser definida como uma variedade de movimentos ou métodos utilizados para se mover de um ponto a outro. O controle locomotor envolve uma rede

hierárquica de circuitos do SNC que incluem gânglios da base, córtex, formação reticular, cerebelo, aparelho vestibular, medula espinhal e tálamo, sendo influenciado pelas estruturas do SNC e pelas variáveis condições internas e externas do organismo, mediante necessidade. Além disso, o controle da locomoção pode ser feito mediante estímulos de neurotransmissores (MYSLIVECEK; FARAR; VALUSKOVA, 2017). Como já é conhecida a relação da atividade física tanto em termos de locomoção quanto em fatores cognitivos (MAEJIMA et al., 2018), a análise e correlação desses fatores poderia trazer dados importantes.

2.7. Memória de reconhecimento

A memória de reconhecimento é a discriminação entre diferentes eventos, sendo um particularmente familiar e outro novo (AGGLETON; BROWN, 2006; ROBINSON; BONARDI, 2015). A capacidade de reconhecer objetos tem sido amplamente estudada, uma vez que é considerada uma função cognitiva vital, principalmente em termos evolutivos da espécie (BIRD, 2017). Funcionalmente, algumas regiões do cérebro já foram associadas os diferentes tipos de memória, tanto em humanos quanto em não humanos. Estudos em roedores evidenciaram relações entre memória e córtex perirrinal, regiões corticais pré-frontais e hipocampo (BIRD, 2017; ROBINSON; BONARDI, 2015). No hipocampo, as regiões CA1, CA3 e giro dentado são as partes mais importantes para o aprendizado e a memória (WU et al., 2009).

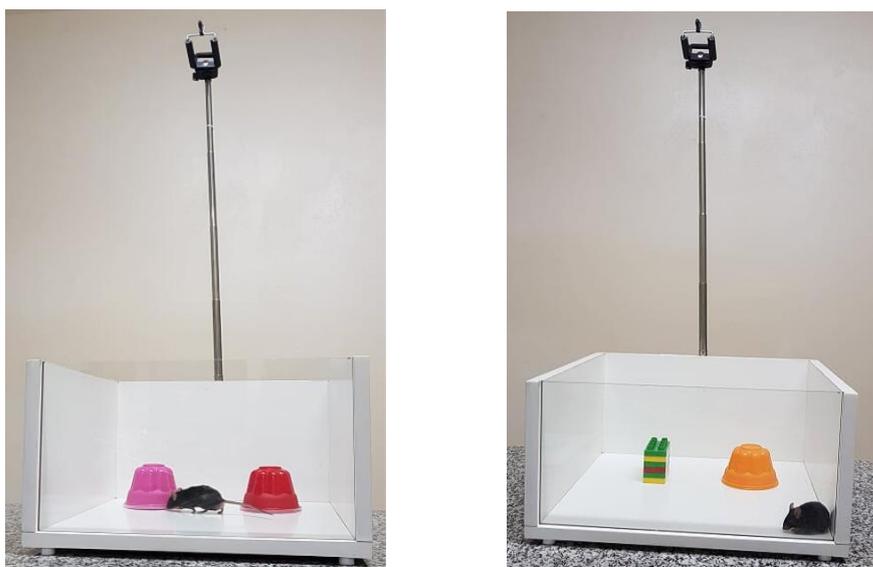
Apesar de poucos, alguns trabalhos já relacionaram cumarinas à memória de reconhecimento. A 7-hidroxi-5-metoxi-4-metil-3-(4-metilpiperazin-1-il)-cumarina, é uma cumarina recentemente sintetizada que induziu melhora significativa de aspectos relacionados à memória de ratos tratados com ácido ocláico e submetidos ao teste do labirinto aquático de Morris (SONG et al., 2016). A escopoletina foi capaz de melhorar funções cognitivas e de memória relacionado à idade em camundongos de 15 e 18 meses de idade. Os autores exploraram o mecanismo envolvido nos neurotransmissores colinérgicos e identificaram que a cumarina teve atividade agonista dos receptores de acetilcolina, aumentando a liberação de seus neurotransmissores e promovendo plasticidade neural no hipocampo (HORNICK et al., 2011).

Modelos experimentais com animais, principalmente camundongos são utilizados de maneira ampla para explorar mecanismos básicos e patologias relacionadas a déficits de memória, principalmente para o desenvolvimento de terapêuticas e fármacos. Camundongos tem elevada capacidade de lembrar e codificar informações de memória espacial, com utilização do lobo temporal medial do cérebro para armazenamento à longo prazo. Portanto, se

tornou comum o uso de testes que examinam a memória de roedores por meio de relações espaciais e reconhecimento de objetos, sendo esses de aplicabilidade simples e eficiente (VOGEL-CIERNIA; WOOD, 2014).

Uma das formas mais diretas de medir a memória de reconhecimento de roedores é com a utilização de tarefas que visam o reconhecimento de objetos com base na medição de preferência espontânea pelo novo. Além disso, é possível a utilização de diversas arenas ou labirintos que atendam ao protocolo escolhido (WARBURTON; BROWN, 2015). Um dos protocolos já estabelecidos é o Teste de Reconhecimento de Objeto (TRO), que expõe o animal a familiarização de dois objetos semelhantes e posteriormente a um objeto novo na fase de teste. A capacidade de reconhecimento do objeto novo reflete dados relacionados a memória de reconhecimento deste animal (LEGER et al., 2013). O modelo utilizado pode ser visualizado na Figura 9:

Figura 9 - Visão frontal da estrutura do teste de reconhecimento de objeto.



Fonte: arquivo pessoal do autor.

3. JUSTIFICATIVA

Considerando a importância fisiológica do processo neurogênico para melhora de atividades do sistema nervoso central, uma vez que o aumento de neurônios funcionais tem sido relacionado positivamente a aspectos comportamentais como a ansiedade e cognitivos como memória e aprendizagem, investigar o uso de substâncias que possam potencializar esse processo poderia contribuir futuramente para intervenções afim de possibilitar este processo.

Além disso, algumas cumarinas tem sido investigada quanto a processos de neuroproteção e proliferação celular, mas não foram encontrados até então, intervenções que explorassem este efeito em concomitância com a atividade física, sendo essa um já estabelecido estímulo neurogênico.

Adicionalmente, investigar a atividade das cumarinas relacionadas diretamente com a ansiedade e memória pode fornecer informações importantes e específica sobre o composto estudado, uma vez que as cumarinas se caracterizam como uma vasta classe de compostos constantemente em expansão devido sua característica que facilita processos de síntese e reestruturação química. Neste sentido, a busca de tratamentos para transtornos cognitivos e melhora de hábitos de atividade física, o uso de um composto cumarínico sintético que apresente fatores neuroprotetores e alteração nos hábitos de atividade física voluntária poderia propiciar maior entendimento dos mecanismos moleculares envolvidos nessa regulação e posterior aplicação terapêutica.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo geral

Verificar os efeitos da administração de cumarina na indução da neurogênese, no comportamento e no padrão de atividade física em camundongos submetidos à roda de atividade voluntária.

4.2. Objetivos específicos

- Avaliar possíveis efeitos da administração da 4-metildinafetina no estímulo de atividade física, mensurado através da roda de atividade livre;
- Avaliar efeitos nos parâmetros comportamentais relacionados à ansiedade e memória de reconhecimento através do teste de labirinto em cruz elevado e teste de reconhecimento de objeto, respectivamente;
- Determinar a neurogênese através de técnica de imunofluorescência utilizando marcador celular;
- Investigar os efeitos da atividade física voluntária sobre o comportamento, memória e neurogênese dos animais submetidos à roda de atividade livre;

5. REFERÊNCIAS

- ACREE, L. S. et al. Physical activity is related to quality of life in older adults. **Health and quality of life outcomes**, [s.l.], v. 4, p. 37, 2006. ISSN: 1477-7525, DOI: 10.1186/1477-7525-4-37.
- AGUIRRE, P. et al. Neuroprotective Effect of a New 7,8-Dihydroxycoumarin-Based Fe²⁺/Cu²⁺ Chelator in Cell and Animal Models of Parkinson's Disease. **ACS Chemical Neuroscience**, [s.l.], v. 8, no 1, p. 178–185, 2017
- ALLENDORFER, J. B.; ARIDA, R. M. Role of Physical Activity and Exercise in Alleviating Cognitive Impairment in People With Epilepsy. **Clinical Therapeutics**, [s.l.], v. 40, no 1, p. 26–34, 2018.
- ALTMAN, J.; DAS, G. D. Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. **The Journal of comparative neurology**, [s.l.], v. 124, no 3, p. 319–35, 1965.
- ANACKER, C.; HEN, R. Adult hippocampal neurogenesis and cognitive flexibility — linking memory and mood. **Nature Reviews Neuroscience**, [s.l.], v. 18, no 6, p. 335–346, 2017.
- ANGEVAREN, M. et al. Physical activity and enhanced fitness to improve cognitive function in older people without known cognitive impairment. In: ANGEVAREN, M. (Org.). **Cochrane Database of Systematic Reviews**. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2008.
- BELLENCHI, G. C. et al. Adult neural stem cells: an endogenous tool to repair brain injury? **Journal of Neurochemistry**, [s.l.], v. 124, no 2, p. 159–167, 2013.
- CAPRA, J. C. et al. Antidepressant-like effect of scopoletin, a coumarin isolated from *Polygala sabulosa* (Polygalaceae) in mice: Evidence for the involvement of monoaminergic systems. **European Journal of Pharmacology**, [s.l.], v. 643, no 2–3, p. 232–238, 2010.
- CESA, C. C. et al. Physical activity and cardiovascular risk factors in children: meta-analysis of randomized clinical trials. **Preventive Medicine**, [s.l.], v. 69, p. 54–62, 2014.
- CHAO, X. et al. Neuroprotective effect of osthole against acute ischemic stroke on middle cerebral ischemia occlusion in rats. **Brain Research**, [s.l.], v. 1363, p. 206–211, 2010.
- CHRISTIAN, K. M.; SONG, H.; MING, G. Functions and dysfunctions of adult hippocampal neurogenesis. **Annual review of neuroscience**, [s.l.], v. 37, p. 243–62, 2014.
- CHU, A. H. Y. et al. Do workplace physical activity interventions improve mental health outcomes? **Occupational Medicine**, [s.l.], v. 64, no 4, p. 235–245, 2014.
- DETSI, A.; KONTOGIORGIS, C.; HADJIPAVLOU-LITINA, D. Coumarin derivatives: an updated patent review (2015-2016). **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, [s.l.], v. 27, no 11, p. 1201–1226, 2017.
- DOMSCHKE, K.; MARON, E. Genetic Factors in Anxiety Disorders. In: **Modern trends in**

pharmacopsychiatry. [s.l.: s.n.]29p. 24–46, 2013.

FARMER, J. et al. Effects of voluntary exercise on synaptic plasticity and gene expression in the dentate gyrus of adult male sprague–dawley rats in vivo. **Neuroscience**, [s.l.], v. 124, no 1, p. 71–79, 2004.

FELGER, J. C. Imaging the Role of Inflammation in Mood and Anxiety-related Disorders. **Current neuropharmacology**, v. 16, n. 5, p. 533–558, 2018.

FERREIRA MELLO, B. S.; et al. Effects of doxycycline on depressive-like behavior in mice after lipopolysaccharide (LPS) administration. **Journal of Psychiatric Research**, v. 47, n. 10, p. 1521–1529, out. 2013.

FERREIRA, S. Z. et al. Synthesis of a New Peptide–Coumarin Conjugate: A Potential Agent against Cryptococcosis. **ACS Medicinal Chemistry Letters**, [s.l.], v. 6, no 3, p. 271–275, 2015.

FOSTER, J. A.; RINAMAN, L.; CRYAN, J. F. Stress & the gut-brain axis: Regulation by the microbiome. **Neurobiology of Stress**, v. 7, p. 124–136, dez. 2017.

FUCHS, E.; FLÜGGE, G. Adult neuroplasticity: more than 40 years of research. **Neural plasticity**, [s.l.], v. 2014, p. 541870, 2014.

FUJIKAWA, T.; CASTORENA, C. M.; LEE, S.; ELMQUIST, J. K. The hypothalamic regulation of metabolic adaptations to exercise. **Journal of neuroendocrinology**, v. 29, n. 10, 2017.

GAGE, F. H. Mammalian neural stem cells. **Science (New York, N.Y.)**, [s.l.], v. 287, no 5457, p. 1433–8, 2000.

GAYNES, B. N.; et al. What did STARD teach us? Results from a large-scale, practical, clinical trial for patients with depression. **Psychiatric services (Washington, D.C.)**, v. 60, n. 11, p. 1439–45, 2009.

GAO, Q. et al. Nodakenin Enhances Cognitive Function and Adult Hippocampal Neurogenesis in Mice. **Neurochemical Research**, [s.l.], v. 40, no 7, p. 1438–1447, 2015.

GAO, Z. et al. Osthole augments therapeutic efficiency of neural stem cells-based therapy in experimental autoimmune encephalomyelitis. **Journal of pharmacological sciences**, [s.l.], v. 124, no 1, p. 54–65, 2014.

GARRETT, L. et al. Voluntary wheel running in mice increases the rate of neurogenesis without affecting anxiety-related behaviour in single tests. **BMC Neuroscience**, [s.l.], v. 13, no 1, p. 61, 2012.

GE, S. et al. GABA sets the tempo for activity-dependent adult neurogenesis. **Trends in Neurosciences**, [s.l.], v. 30, no 1, p. 1–8, 2007.

GOMES DA SILVA, S.; ARIDA, R. M. Physical activity and brain development. **Expert Review of Neurotherapeutics**, [s.l.], v. 15, no 9, p. 1041–1051, 2015.

- GOULD, E. How widespread is adult neurogenesis in mammals? **Nature Reviews Neuroscience**, [s.l.], v. 8, no 6, p. 481–488, 2007.
- HAGG, T. Molecular regulation of adult CNS neurogenesis: an integrated view. **Trends in Neurosciences**, [s.l.], v. 28, no 11, p. 589–595, 2005.
- HEMSHEKHAR, M. et al. Antiarthritic and antiinflammatory propensity of 4-methylesculetin, a coumarin derivative. **Biochimie**, [s.l.], v. 95, no 6, p. 1326–1335, 2013.
- HILL, A. S.; SAHAY, A.; HEN, R. Increasing Adult Hippocampal Neurogenesis is Sufficient to Reduce Anxiety and Depression-Like Behaviors. **Neuropsychopharmacology**, [s.l.], v. 40, no 10, p. 2368–2378, 2015.
- HORNICK, A.; LIEB, A.; VO, N. P.; ROLLINGER, J. M.; STUPPNER, H.; PRAST, H. The coumarin scopoletin potentiates acetylcholine release from synaptosomes, amplifies hippocampal long-term potentiation and ameliorates anticholinergic- and age-impaired memory. **Neuroscience**, v. 197, p. 280–292, 1 dez. 2011.
- HOULT, J. R.; PAYÁ, M. Pharmacological and biochemical actions of simple coumarins: natural products with therapeutic potential. **General pharmacology**, [s.l.], v. 27, no 4, p. 713–22, 1996.
- JIN, X. et al. 7,8-Dihydroxy-4-methylcoumarin Provides Neuroprotection by Increasing Hippocalcin Expression. **Neurotoxicity Research**, [s.l.], v. 27, no 3, p. 268–274, 2015.
- KADAKOL, A. et al. Esculetin: A phytochemical endeavor fortifying effect against non-communicable diseases. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, [s.l.], v. 84, p. 1442–1448, 2016.
- KANG, S. Y.; KIM, Y. C. Decursinol and decursin protect primary cultured rat cortical cells from glutamate-induced neurotoxicity. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, [s.l.], v. 59, no 6, p. 863–870, 2007.
- KATSORI, A.-M.; HADJIPAVLOU-LITINA, D. Coumarin derivatives: an updated patent review (2012-2014). **Expert opinion on therapeutic patents**, [s.l.], v. 24, no 12, p. 1323–47, 2014.
- KAUR, M. et al. Coumarin: a promising scaffold for anticancer agents. **Anti-cancer agents in medicinal chemistry**, [s.l.], v. 15, no 8, p. 1032–48, 2015.
- KHAN, K. M. et al. Synthesis of coumarin derivatives with cytotoxic, antibacterial and antifungal activity. **Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry**, [s.l.], v. 19, no 4, p. 373–9, 2004.
- KIM, Y.-K.; JEON, S. W. Neuroinflammation and the Immune-Kynurenine Pathway in Anxiety Disorders. **Current Neuropharmacology**, v. 16, n. 5, p. 574–582, 2018.
- LACHMAN, M. E. et al. When Adults Don't Exercise: Behavioral Strategies to Increase Physical Activity in Sedentary Middle-Aged and Older Adults. **Innovation in Aging**, [s.l.], v. 2, no 1, p. igy007, 2018.

- LAKE, B. G. Coumarin metabolism, toxicity and carcinogenicity: relevance for human risk assessment. **Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association**, [s.l.], v. 37, no 4, p. 423–53, 1999.
- LANGLOIS, F. et al. Benefits of Physical Exercise Training on Cognition and Quality of Life in Frail Older Adults. **The Journals of Gerontology Series B: Psychological Sciences and Social Sciences**, [s.l.], v. 68, no 3, p. 400–404, 2013.
- LEE, D. A. et al. Tanycytes of the hypothalamic median eminence form a diet-responsive neurogenic niche. **Nature Neuroscience**, [s.l.], v. 15, no 5, p. 700–702, 2012.
- LEE, H.-I. et al. Scopoletin prevents alcohol-induced hepatic lipid accumulation by modulating the AMPK–SREBP pathway in diet-induced obese mice. **Metabolism**, [s.l.], v. 63, no 4, p. 593–601, 2014.
- LEGER, M. et al. Object recognition test in mice. **Nature Protocols**, [s.l.], v. 8, no 12, p. 2531–2537, 2013.
- LI, H.; YAO, Y.; LI, L. Coumarins as potential antidiabetic agents. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, [s.l.], v. 69, no 10, p. 1253–1264, 2017.
- LI, R. et al. Analgesic effect of coumarins from *Radix angelicae pubescentis* is mediated by inflammatory factors and TRPV1 in a spared nerve injury model of neuropathic pain. **Journal of Ethnopharmacology**, [s.l.], v. 195, p. 81–88, 2017.
- LLEDO, P.-M.; ALONSO, M.; GRUBB, M. S. Adult neurogenesis and functional plasticity in neuronal circuits. **Nature Reviews Neuroscience**, [s.l.], v. 7, no 3, p. 179–193, 2006.
- MARLATT, M. W. et al. Running throughout middle-age improves memory function, hippocampal neurogenesis, and BDNF levels in female C57BL/6J mice. **Developmental Neurobiology**, [s.l.], v. 72, no 6, p. 943–952, 2012.
- MARTÍN-ARAGÓN, S.; VILLAR, Á.; BENEDÍ, J. Age-dependent effects of esculetin on mood-related behavior and cognition from stressed mice are associated with restoring brain antioxidant status. **Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry**, [s.l.], v. 65, p. 1–16, 2016.
- MERRITT, J. R.; RHODES, J. S. Mouse genetic differences in voluntary wheel running, adult hippocampal neurogenesis and learning on the multi-strain-adapted plus water maze. **Behavioural brain research**, [s.l.], v. 280, p. 62–71, 2015.
- MIGAUD, M.; BUTRILLE, L.; BATAILLER, M. Seasonal regulation of structural plasticity and neurogenesis in the adult mammalian brain: Focus on the sheep hypothalamus. **Frontiers in Neuroendocrinology**, [s.l.], v. 37, p. 146–157, 2015.
- MING, G.; SONG, H. Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system. **Annual Review of Neuroscience**, [s.l.], v. 28, no 1, p. 223–250, 2005.
- MISRA, S. et al. Synthesis and biological evaluation of 4-oxycoumarin derivatives as a new class of antifilarial agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 94, p. 211–217, 2015.

- MILLER, J. A.; et al. Conserved molecular signatures of neurogenesis in the hippocampal subgranular zone of rodents and primates. **Development (Cambridge, England)**, v. 140, n. 22, p. 4633–44, 15 nov. 2013.
- MOLINAJIMENEZ, M. et al. Effect of fraxetin on antioxidant defense and stress proteins in human neuroblastoma cell model of rotenone neurotoxicity. Comparative study with myricetin and N-acetylcysteine. **Toxicology and Applied Pharmacology**, [s.l.], v. 209, no 3, p. 214–225, 2005.
- MURRAY, D. K. et al. The effects of exercise on cognition in Parkinson's disease: a systematic review. **Translational neurodegeneration**, [s.l.], v. 3, no 1, p. 5, 2014.
- NASCIMENTO, L. F. R. et al. n-3 Fatty Acids Induce Neurogenesis of Predominantly POMC-Expressing Cells in the Hypothalamus. **Diabetes**, [s.l.], v. 65, no 3, p. 673–686, 2016.
- NEYTS, J. et al. Structure–Activity Relationship of New Anti-Hepatitis C Virus Agents: Heterobicyclic–Coumarin Conjugates. **Journal of Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 52, no 5, p. 1486–1490, 2009.
- NIWA, A. et al. Voluntary exercise induces neurogenesis in the hypothalamus and ependymal lining of the third ventricle. **Brain Structure and Function**, [s.l.], v. 221, no 3, p. 1653–1666, 2016.
- PARK, J.-H.; ENIKOLOPOV, G. Transient elevation of adult hippocampal neurogenesis after dopamine depletion. **Experimental neurology**, [s.l.], v. 222, no 2, p. 267–76, 2010.
- PELLOW, S.; CHOPIN, P.; FILE, S. E.; BRILEY, M. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **Journal of neuroscience methods**, v. 14, n. 3, p. 149–67, ago. 1985.
- PÉREZ-CRUZ, K. et al. Synthesis and antioxidant study of new polyphenolic hybrid-coumarins. **Arabian Journal of Chemistry**, [s.l.], v. 11, no 4, p. 525–537, 2018.
- PIERCE, A. A.; XU, A. W. De novo neurogenesis in adult hypothalamus as a compensatory mechanism to regulate energy balance. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, [s.l.], v. 30, no 2, p. 723–30, 2010.
- POTDAR, M. K.; MOHILE, S. S.; SALUNKHE, M. M. Coumarin syntheses via Pechmann condensation in Lewis acidic chloroaluminate ionic liquid. **Tetrahedron Letters**, [s.l.], v. 42, no 52, p. 9285–9287, 2001.
- PRAAG, H. VAN et al. Running enhances neurogenesis, learning, and long-term potentiation in mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s.l.], v. 96, no 23, p. 13427–31, 1999.
- QIN, T. et al. Umbelliferone reverses depression-like behavior in chronic unpredictable mild stress-induced rats by attenuating neuronal apoptosis via regulating ROCK/Akt pathway. **Behavioural Brain Research**, [s.l.], v. 317, p. 147–156, 2017.
- RECABAL, A.; CAPRILE, T.; GARCÍA-ROBLES, M. de L. A. Hypothalamic Neurogenesis as an Adaptive Metabolic Mechanism. **Frontiers in neuroscience**, [s.l.], v. 11, p. 190, 2017.

REVEST, J.-M.; DUPRET, D.; KOEHL, M.; FUNK-REITER, C.; GROSJEAN, N.; PIAZZA, P.-V.; ABROUS, D. N. Adult hippocampal neurogenesis is involved in anxiety-related behaviors. **Molecular Psychiatry**, v. 14, n. 10, p. 959–967, 3 out. 2009.

RIVEIRO, M. E. et al. Biochemical mechanisms underlying the pro-apoptotic activity of 7,8-dihydroxy-4-methylcoumarin in human leukemic cells. **Biochemical Pharmacology**, [s.l.], v. 75, no 3, p. 725–736, 2008.

SANDHU, S. et al. Coumarin hybrids as novel therapeutic agents. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 22, no 15, p. 3806–3814, 2014.

SARKER, S. D.; NAHAR, L. Progress in the Chemistry of Naturally Occurring Coumarins. **Progress in the chemistry of organic natural products**. [s.l.]: [s.n.], 2017.

SCHOENFELD, T. J.; CAMERON, H. A. Adult Neurogenesis and Mental Illness. **Neuropsychopharmacology**, [s.l.], v. 40, no 1, p. 113–128, 2015.

SHAFIEE, M.; et al. Depression and anxiety symptoms are associated with prooxidant-antioxidant balance: A population-based study. **Journal of Affective Disorders**, v. 238, p. 491–498, out. 2018.

SHARMA, D.; KUMAR, S.; MAKRANDI, J. K. Modified Pechmann condensation using grinding technique under solvent-free condition at room temperature. **Green Chemistry Letters and Reviews**, [s.l.], v. 4, no 2, p. 127–129, 2011.

SONG, Y. et al. Natural neuro-inflammatory inhibitors from *Caragana turfanensis*. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, [s.l.], v. 27, no 20, p. 4765–4769, 2017.

SPALDING, K. L. et al. Dynamics of hippocampal neurogenesis in adult humans. **Cell**, [s.l.], v. 153, no 6, p. 1219–1227, 2013.

SULAKHIYA, K. et al. Lipopolysaccharide induced anxiety- and depressive-like behaviour in mice are prevented by chronic pre-treatment of esculetin. **Neuroscience Letters**, [s.l.], v. 611, p. 106–111, 2016.

TAYLOR, C. J.; JHAVERI, D. J.; BARTLETT, P. F. The therapeutic potential of endogenous hippocampal stem cells for the treatment of neurological disorders. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 7, p. 5, 28 jan. 2013.

TAUPIN, P. Neurogenesis in the adult central nervous system. **Comptes Rendus Biologies**, [s.l.], v. 329, no 7, p. 465–475, 2006.

TYAGI, Y. K. et al. Synthesis of novel amino and acetyl amino-4-methylcoumarins and evaluation of their antioxidant activity. **European Journal of Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 40, no 4, p. 413–420, 2005.

VARELA-NALLAR, L.; INESTROSA, N. C. Wnt signaling in the regulation of adult hippocampal neurogenesis. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, [s.l.], v. 7, p. 100, 2013.

VINAYAGAM, R.; XU, B. 7, 8-Dihydroxycoumarin (daphnetin) protects INS-1 pancreatic β -cells against streptozotocin-induced apoptosis. **Phytomedicine**, [s.l.], v. 24, p. 119–126, 2017.

WANG, Z. *Comprehensive Organic Name Reactions and Reagents*. Hoboken, NJ, USA: **John Wiley & Sons, Inc.**, 2010.

WHO. Physical activity. 2018. Disponível em: <<http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/physical-activity>>. Acesso em: 15/jul./18.

WHO. Depression and other common mental disorders. 2018. Disponível em: <<https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/254610/WHO-MSD-MER-2017.2-eng.pdf?sequence=1>>. Acesso em: 01/fev./19.

WU, L.; WANG, X.; XU, W.; FARZANEH, F.; XU, R. The structure and pharmacological functions of coumarins and their derivatives. **Current medicinal chemistry**, v. 16, n. 32, p. 4236–60, 2009.

XU, Y. et al. Neurogenesis in the ependymal layer of the adult rat 3rd ventricle. **Experimental Neurology**, [s.l.], v. 192, no 2, p. 251–264, 2005.

YAU, S. Y. et al. Physical exercise-induced adult neurogenesis: A good strategy to prevent cognitive decline in neurodegenerative diseases? **BioMed Research International**, [s.l.], v. 2014, no Figure 1, 2014.

YOO, S.; BLACKSHAW, S. Regulation and function of neurogenesis in the adult mammalian hypothalamus. **Progress in Neurobiology**, [s.l.], 2018.

YU, S.-M.; HU, D.-H.; ZHANG, J.-J. Umbelliferone exhibits anticancer activity via the induction of apoptosis and cell cycle arrest in HepG2 hepatocellular carcinoma cells. **Molecular Medicine Reports**, [s.l.], v. 12, no 3, p. 3869–3873, 2015.

YUN, C. H.; SHIMADA, T.; GUENGERICH, F. P. Purification and characterization of human liver microsomal cytochrome P-450 2A6. **Molecular pharmacology**, [s.l.], v. 40, no 5, p. 679–85, 1991.

ZENG, K.-W. et al. Anti-Neuroinflammatory Effect of MC13, a Novel Coumarin Compound From Condiment *Murraya*, Through Inhibiting Lipopolysaccharide-Induced TRAF6-TAK1-NF- κ B, P38/ERK MAPKS and Jak2-Stat1/Stat3 Pathways. **Journal of Cellular Biochemistry**, [s.l.], v. 116, no 7, p. 1286–1299, 2015.

SEGUNDA PARTE

6. ARTIGO

**ADMINISTRAÇÃO DE CUMARINA (4-METILDINAFETINA) E SEUS EFEITOS NA
ATIVIDADE FÍSICA VOLUNTÁRIA, COMPORTAMENTO E NEUROGÊNESE DE
CAMUNDONGOS**

**Artigo redigido de acordo com as normas para submissão no periódico
*Physiology and Behavior***

(Versão preliminar)

Administração De Cumarina (4-Metildinafetina) E Seus Efeitos Na Atividade Física Voluntária, Comportamento E Neurogênese De Camundongos

Priscilla K. F. Lopes¹, Moisés S. A. Martins², Daiane F. Engel³, Ana E. D. Souza⁴, Natália O. Moura⁵, Chrystian A. Pereira⁶; Sérgio S. Thomasi⁷, Rodrigo F. Moura^{8,*,†}

¹ Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, Universidade Federal de Lavras, UFLA - Lavras, Minas Gerais, Brasil; prilopesnutricionista@gmail.com (P.K.F.L.);

² Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, Universidade Federal de Lavras, UFLA - Lavras, Minas Gerais, Brasil; moisesdreamcast72@gmail.com (M.S.A.M.);

³ Programa de Pós-doutorado, Laboratório de Sinalização Celular, Universidade de Campinas, UNICAMP - Campinas, São Paulo, Brasil; daiane.engel01@gmail.com (D.F.E)

⁴ Programa de Medicina, Universidade Federal de Lavras, UFLA - Lavras, Minas Gerais, Brasil;

⁵ Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Lavras, UFLA - Lavras, Minas Gerais, Brasil; nataliaoliveiramoura@gmail.com (N.O.M.);

⁶ Departamento de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Lavras, UFLA, Brasil, Minas Gerais; chrystianpereira@dsa.ufla.br (C.A.P);

⁷ Departamento de Química da Universidade Federal de Lavras, UFLA, Lavras, Minas Gerais, Brasil;

⁸ Departamento de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Lavras, UFLA - Campus Universitário - PV8; CEP 37200-000 - Lavras, Minas Gerais, Brasil; mourafit@yahoo.com.br (R.F.M.).

* Correspondência: mourafit@yahoo.com.br.

Todos os autores contribuíram igualmente para este trabalho.

Resumo

A 4-metildinafetina é uma cumarina sintetizada, precursora de derivados 4-metilcumarínicos e tem suas atividades biológicas relacionadas à ação antioxidante, neuroprotetora e anti-inflamatória. O presente estudo teve como objetivo verificar os efeitos da administração oral da cumarina 4-metildinafetina em processos relacionados à atividade física voluntária, comportamento e neurogênese. Camundongos C57BL6 com 8 semanas de idade foram separados em quatro grupos para observar os efeitos da 4-metildinafetina (30mg/kg) na atividade física voluntária, comportamento e neurogênese. Parte dos animais foram expostos à roda de atividade física voluntária. Testes comportamentais foram aplicados para avaliar a memória de reconhecimento, o índice de locomoção e o comportamento relacionado à ansiedade. Análises imunofluorescência foram realizadas para caracterizar a proliferação celular relacionada à neurogênese. Doses de 30mg/kg/dia da cumarina 4-metildinafetina não demonstraram efeitos sobre a velocidade e volume médio da atividade voluntária. Porém, foi observado menor volume total percorrido no período diurno. Não foram observadas diferenças na neurogênese. A atividade física apresenta efeito positivo no comportamento relacionado à ansiedade e locomoção.

Palavras-chave: compostos fenólicos, 7,8-di-hidroxi-4-metilcumarina, neuroproteção, atividade física, comportamento.

1 INTRODUÇÃO

As cumarinas são polifenóis que constituem uma grande classe de compostos heterocíclicos de oxigênio, inicialmente encontradas como metabólitos secundários de plantas. Possuem elevada biodisponibilidade, baixo peso molecular e processos simples para síntese (WU et al., 2009). A conformação química básica constitui um anel de benzeno ligado a um anel de pirona e seu núcleo cíclico possui seis diferentes opções de campos para rearranjos de substituintes estruturais, o que possibilita uma variedade de moléculas secundárias (DETSI; KONTOGIORGIS; HADJIPAVLOU-LITINA, 2017).

A 4-metildinafetina (7,8-di-hidroxi-4-metilcumarina) é uma cumarina sintetizada por processos relativamente simples, de baixo custo e com bons rendimentos (POTDAR; MOHILE; SALUNKHE, 2001). Pode ser considerada uma cumarina simples, uma vez que a substituição estrutural ocorre apenas no anel benzeno utilizando dois radicais hidroxila (WU et al., 2009). Estudos *in vitro* apontaram para um possível efeito neuroprotetor desta cumarina, relacionado principalmente com suas propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias (JIN et al., 2015; TOGNA et al., 2014; TYAGI et al., 2005). Substâncias com atividade anti-inflamatória e antioxidante podem ter ação protetora atuando como fator de melhora na sobrevivência para as células do Sistema Nervoso Central (SNC), protegendo funcionalmente os neurônios e criando ambiente favorável para expansão neuronal, processo conhecido como neurogênese (GAO, Z. et al., 2014).

A neurogênese em adultos é um processo que depende de vários estímulos e seus mecanismos moleculares ainda não foram totalmente elucidados (HAGG, 2005). Porém alguns fatores exógenos e endógenos podem mediar a neurogênese. O perfil modulatório da alimentação e da atividade física são importantes estimuladores da neurogênese, que também tem sido relacionada ao aspecto comportamental e cognitivo do indivíduo, demonstrando efeitos positivos relacionados à ansiedade e depressão (ANACKER; HEN, 2017a; LEE, D. A. et al., 2012a). Alguns trabalhos demonstraram resultados positivos ao relacionar diferentes cumarinas à neurogênese e seus benefícios (GAO, Q. et al., 2015; LIU et al., 2015; YAO et al., 2015). Assim, o objetivo do presente estudo foi investigar os efeitos da administração da cumarina 4-metildinafetina *in vivo* e seus efeitos sobre o estímulo à neurogênese, atividade voluntária e efeitos comportamentais relacionados à ansiedade e memória de reconhecimento.

2 METODOLOGIA

Todos os experimentos foram conduzidos segundo as normas estabelecidas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Lavras (CEUA/UFLA) (Protocolo 078/17). Trinta e dois camundongos machos C57/Bl6 com oito semanas de idade foram obtidos do Biotério Central Multiusuário da UFLA e submetidos ao experimento. Os animais foram alojados em gaiolas individuais de polietileno, à temperatura ambiente $22\pm 2^{\circ}\text{C}$, luminosidade controlada em ciclos claro/escuro de 12/12 horas e oferta *ad libitum* de ração regular para roedores (Nuvilab®). Estas condições foram mantidas durante todas as fases do experimento, inclusive nos testes comportamentais.

Os animais foram separados em quatro grupos experimentais (n=8/grupo): SV (sedentário veículo), SCum (sedentário cumarina), AFV (atividade física veículo) e AFCum (atividade física cumarina). Os grupos cumarina receberam diariamente dose única de 30 mg/kg da cumarina (4-metildinafetina) via gavagem. A dose foi estabelecida segundo valor aproximado ao encontrado recentemente na literatura relacionado a outras cumarinas sob o mesmo método de administração e que apresentaram os efeitos fisiológicos estudados (MARTÍN-ARAGÓN; VILLAR; BENEDÍ, 2016; QIN et al., 2017). Os animais controle receberam apenas a solução veículo sob a mesma condição. Durante os dez primeiros dias, os animais também receberam (12/12h) 50 mg/kg por injeção intraperitoneal do marcador de proliferação celular 5-bromo-2-desoxiuridina (BrdU) (#B5002, Sigma-Aldrich, Inc.) (Figura 1).

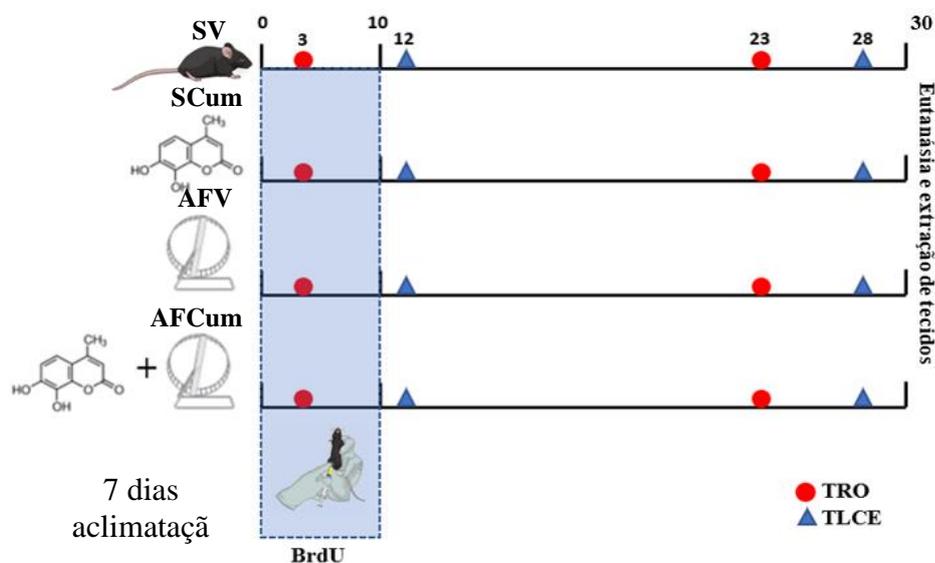


Figura 1. Delineamento experimental. Todos os animais foram mantidos por um período de 7 dias de aclimação. Posteriormente, foram distribuídos proporcionalmente segundo propensão à atividade física em 4 grupos experimentais (n=8/grupo): SV (sedentário veículo), SCum (sedentário cumarina), AFV (atividade física veículo) e AFCum (atividade física cumarina). Do primeiro ao décimo dia todos os animais receberam via intraperitoneal injeção do marcador de proliferação celular (50mg/kg 2x dia, intervalo de 12 horas). Dois grupos tiveram livre acesso à roda de atividade física voluntária durante todo o experimento (AFV e AFCum). Dois grupos receberam via gavagem 30 mg/kg da 4-metildinafetina (período da tarde, 1 x dia). No terceiro e vigésimo terceiro dia de experimento os animais foram submetidos ao teste de reconhecimento de objeto. No décimo segundo e vigésimo oitavo dia de experimento os animais foram submetidos ao teste de labirinto em cruz elevado. No trigésimo dia de experimento, os animais foram anestesiados, eutanasiados e foi realizada a extração do encéfalo para análises de imunofluorescência.

2.1 Cumarina

A 4-metildinafetina (fórmula molecular: $C_{10}H_8O_4$; nome IUPAC: 7,8-di-hidroxi-4-metilcromeno-2-ona; sinônimo na literatura científica: 7,8-di-hidroxi-4-metilcumarina; peso molar: 192.17 g/mol) foi obtida em parceria com o Departamento de Química da Universidade Federal de Lavras (UFLA) por processo de síntese conforme descrito por Kathuria e colaboradores (2009) (KATHURIA et al., 2009). Como resultado do processo de síntese, foi alcançada uma 4-metildinafetina com 97% de pureza e aproximadamente 75% de rendimento. O veículo utilizado foi um composto por soro fisiológico + 1% de Tween-20 + 0,3% carboximetilcelulose.

2.2 Atividade física voluntária

Para mensuração do padrão de atividade física por meio do exercício voluntário, dois grupos (AFV e AFCum) tiveram livre acesso à roda de atividade durante os trinta dias de experimento. As rodas de atividade voluntária foram instaladas dentro da gaiola e possuem um sensor de rotações conectado à uma interface e programa de registro dessas informações (Columbus Instruments®). Ao final do experimento, o volume total de atividade física voluntária no período e a velocidade média foram quantificados e estratificados dentro dos períodos claro e escuro para avaliação do padrão comportamental de atividade.

2.3 Testes comportamentais

2.3.1 Teste de Reconhecimento de Objeto (TRO)

O TRO foi utilizado com o objetivo de fornecer dados sobre memória de reconhecimento e realizado como descrito por LEGER et al., 2013.

Foi utilizada uma caixa de madeira (33×33×20cm) branca e 3 objetos semelhantes (triplicata) e um objeto diferente em forma e textura. Os objetos foram colocados a 5 cm de distância de cada uma das duas paredes do fundo da caixa e randomizados a cada troca de animal. A iluminação foi feita de modo que contemplasse todas as áreas da caixa, sem propagação de cantos escuros ou sombras. No início do teste, os camundongos foram colocados no centro da caixa com dois objetos semelhantes. Após esse tempo aos animais eram retirados, a caixa era limpa com álcool 70 % e ambos objetos eram trocados (um semelhante em triplicata e outro por objeto diferente aos demais). Cada fase do teste durou 5 minutos. Foi considerado comportamento exploratório sempre que o camundongo cheirasse o objeto ou tocasse no objeto enquanto olhava para ele (ou seja, quando a distância entre o nariz e o objeto fosse menor que 2 cm). Para mensurar o tempo para reconhecimento do novo objeto foi considerado o tempo de latência do camundongo na fase de teste, que corresponde ao tempo gasto para exploração do objeto novo desde o tempo 0 do teste. As imagens foram capturadas utilizando uma câmera de captura ajustada para o tempo de interesse, para que não houvesse a necessidade de permanência do avaliador dentro da sala de testes no momento. Posteriormente, o número de entradas e o tempo gasto em cada um dos braços foram mensurados através de vídeo, por dois avaliadores cegos ao tratamento, utilizando cronômetro padrão.

2.3.2 Teste de Labirinto em Cruz Elevado (TLCE)

O TLCE é utilizado para reconhecimento dos comportamentos relacionados à ansiedade. Foi realizado como descrito por KOMADA; TAKAO; MIYAKAWA, 2008, adaptado segundo PELLOW; FILE, 1986.

O labirinto em cruz elevado (LCE) utilizado possui distância de 50 cm do solo e formado por dois braços abertos (50 x 10 cm) e dois braços fechados (50x10x40 cm) em um ângulo de 90 °, mantido com níveis de iluminação semelhantes nos braços abertos e fechados. No início do teste, camundongos foram colocados no centro de frente para um braço fechado e foram então autorizados a explorar o labirinto por 5 min. As entradas foram definidas como entrar em um braço com as quatro patas. As imagens foram capturadas utilizando uma câmera de captura ajustada para o tempo de interesse, para que não houvesse a necessidade de permanência do avaliador dentro da sala de testes no momento. Posteriormente, o número de entradas e o tempo gasto em cada um dos braços foram mensurados através de vídeo, por dois avaliadores cegos ao tratamento, utilizando cronômetro padrão.

2.6 Imunofluorescência

No dia 30 do experimento os animais foram anestesiados com uma mistura de ketamina (45mg/kg) e xilazina (5mg/kg). Foi realizada a perfusão de parte dos animais de cada grupo através da artéria aorta ascendente, com 20 ml de tampão fosfato salina (PBS) 0,01 M, pH 7.4 e em seguida com 20 ml de solução de paraformaldeído (PFA) 4% em tampão fosfato 0,1 M. O encéfalo foi dissecado e transferido para solução contendo 30% de sacarose em tampão fosfato 0,1 M, pH 7.2. Posteriormente o encéfalo foi embebido em composto Tissue-Tek OCT (Sakura Finetek, Torance, CA) e seccionado a uma espessura de 20 µm em criostato de acordo o Atlas de Coordenadas Estereotáxicas (Bregma -1,06 a -2,46, Praxinos e Watson, 1980) em seções contendo ambas estruturas (hipocampo e hipotálamo).

As seções seriadas (1 em cada 6) foram primeiro lavadas com PBS (0,1M) por 3 vezes. Em seguida foram incubadas em ácido clorídrico (HCl) 2N durante 60 minutos. E nova incubação com borato de sódio (pH 8,5) durante 15 minutos. Novo enxague com PBS foi repetido e depois, realizado bloqueio com soro 10% em saponina 0,2% PBS por 1 hora. Na sequência as lâminas foram incubadas por 48 horas a 4°C com anticorpo anti-BrdU (rat, 1:200, AB6326; ABCAM Inc., Cambridge, Inglaterra), anticorpo anti-DCX (rabit, 1:100, B2712, Santa

Cruz Biotechnology Dallas, Texas). Após as 48 horas foi realizada nova sequência de enxágue com PBS e as lâminas foram incubadas com os anticorpos secundários IgG anti-Rat (rabbit, 1:500, AB6730; ABCAM Inc., Cambridge, Inglaterra) e anti-goat (mouse, 1:200, B2354, Santa Cruz Biotechnology Dallas, Texas) e mantidos por 2 horas. Finalmente, as seções foram lavadas três vezes em PBS e montadas em lâminas de vidro.

2.7 Contagem de células

O resultado do processo de imunofluorescência foi visualizado usando um microscópio de varredura a laser confocal Upright Zeiss Axio Examiner com sistema de varredura Laser Zeiss LSM-780 (Carl Zeiss, Jena, Alemanha) para a avaliação da co-localização de células positivas para BrdU e células positivas para DCX. DCX (*Doublecortin*) é uma proteína expressa em células precursoras neuronais e neurônios imaturos (neuroblastos). A quantificação de células positivas para BrdU/DCX no hipotálamo e hipocampo foi realizada usando um método segundo relatado anteriormente por Kempermann e colaboradores (2003) (KEMPERMANN, et al 2003).

2.8 Análise estatística

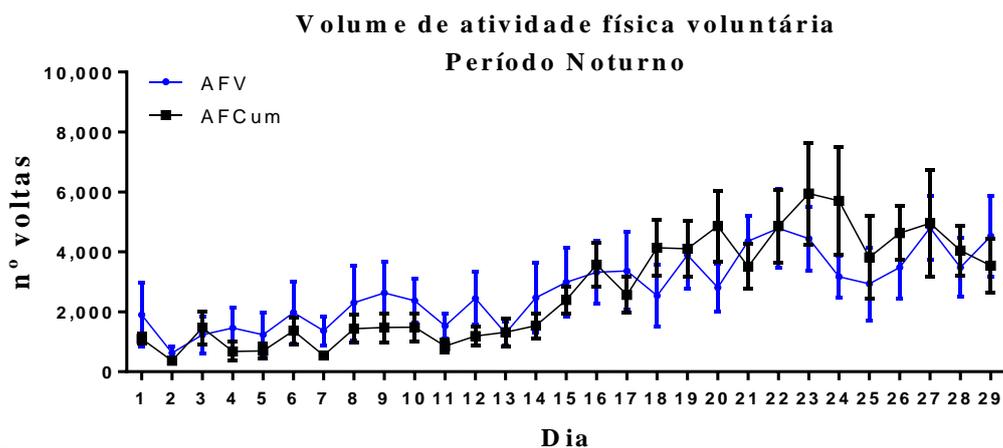
Os dados foram analisados por meio de análise de variância de uma ou duas vias (ANOVA), seguida do teste post hoc de Bonferroni, quando F foi significativo. Para comparação de dois grupos independentes para amostras independentes, foi utilizado o teste t-Student. Os dados são apresentados como média \pm EPM (erro padrão da média). O nível de significância aceito para os testes foi $P < 0.05$. Estatísticas e todos os gráficos foram realizados usando o GraphPad Prism[®].

3 RESULTADOS

3.1 Atividade física voluntária

O volume de atividade física voluntária foi verificado diariamente durante os 29 dias da administração da cumarina. O volume de atividade física corresponde ao número total de voltas completadas, divididos por períodos de 12/12 horas, sendo noturno (18:01 às 06:00) e diurno (06:01 às 18:00) (Figura 2):

A



B

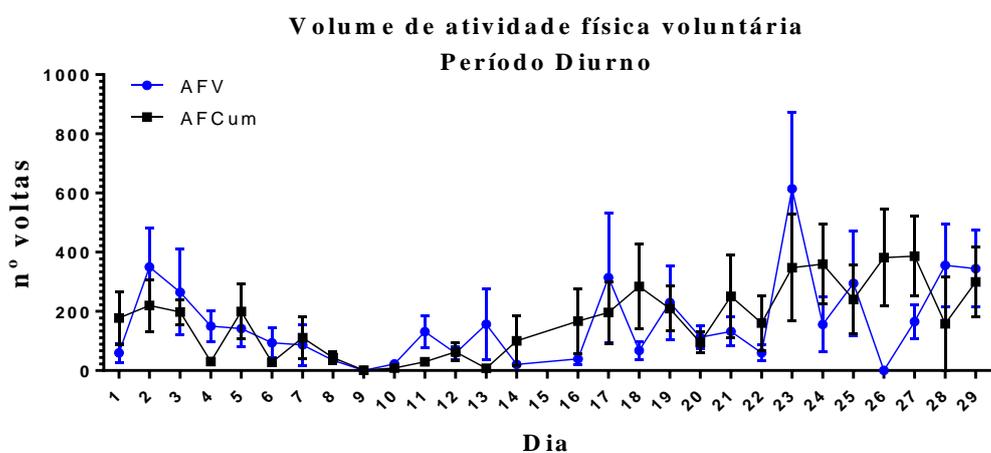


Figura 2. Volume diário de atividade física voluntária. A) Período noturno. B) Período diurno. Dois grupos (n=8) sendo: AFCum: Atividade Física Cumarina; AFV: Atividade Física Veículo. Anova One-Way em relação ao tratamento com cumarina.

Não houve diferença entre os volumes diários de atividade física apresentados entre os grupos AFV/AFCum. Em seguida avaliamos o volume total por período. Os valores correspondem a soma das rotações durante os 29 dias de exposição. Em relação aos volumes totais, o grupo AFCum teve um volume total de atividade física inferior ao grupo AFV (Figura 3):

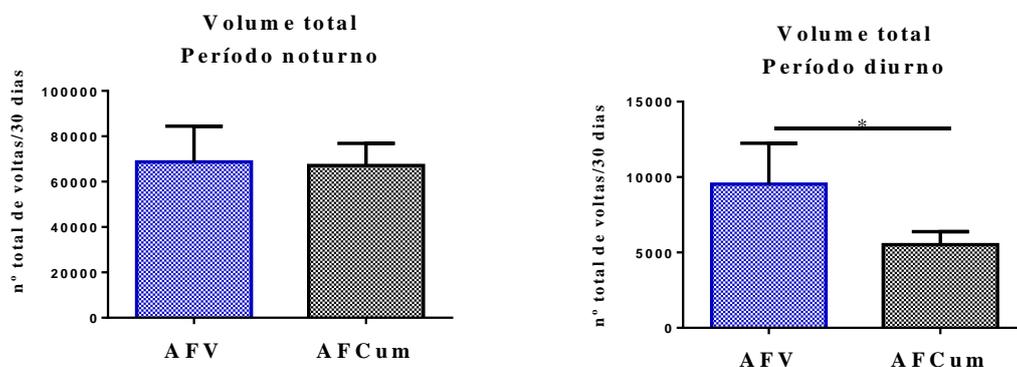


Figura 3. Volume total de atividade física voluntária. A) Período noturno. B) Período diurno. Dois grupos (n=8) sendo: AFV: Atividade Veículo e AFCum Atividade Física Cumarina). Teste t-student, cumarina e atividade física para ambos períodos (noturno e diurno) * (p<0.05).

Para observar se a velocidade média dos animais seguiu o mesmo padrão do volume, a mesma foi calculada e apresentada em rotações por minuto (rpm) (Figura 4):

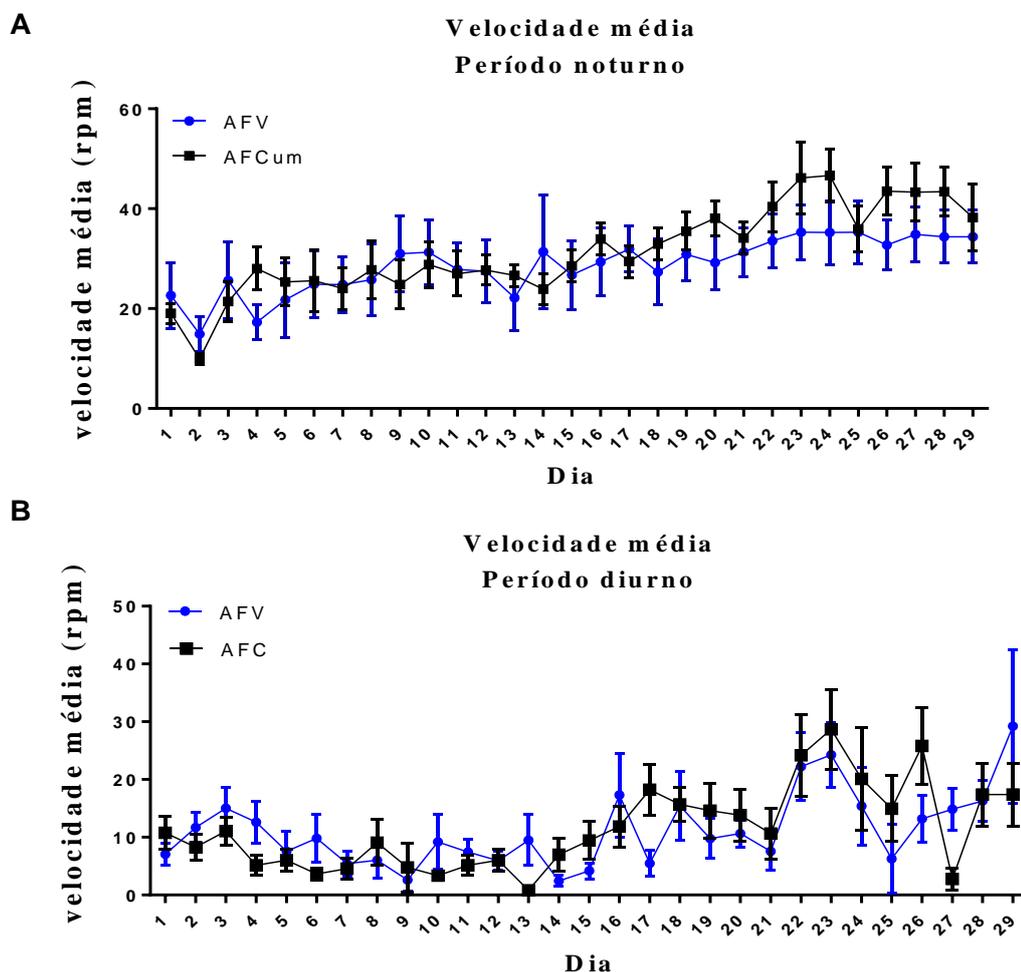


Figura 4. Velocidade média no período. A) Período noturno. B) Período diurno. Dois grupos (n=8) sendo: AFCum: Atividade Física Cumarina; AFV: Atividade Física Veículo. Anova One-Way em relação ao tratamento com cumarina.

Apesar dos grupos apresentarem uma constante evolução da velocidade ao decorrer do experimento no período noturno, a administração da cumarina também não influenciou na velocidade dos animais quando comparada ao veículo. No período diurno também não houve diferença entre os grupos AFV/AFCum, porém houve uma oscilação maior na velocidade total apresentada por ambos os grupos ao decorrer do tempo.

Para tentar aprofundar nos dados acima, nós investigamos a velocidade média final e as velocidades máxima e mínima dos animais de cada grupos. Não houve diferença na velocidade média final entre AFV/AFCum em nenhum período, embora a velocidade média final apresentada pelo grupo AFCum tenha tido menor variação entre os animais (Figura 5):

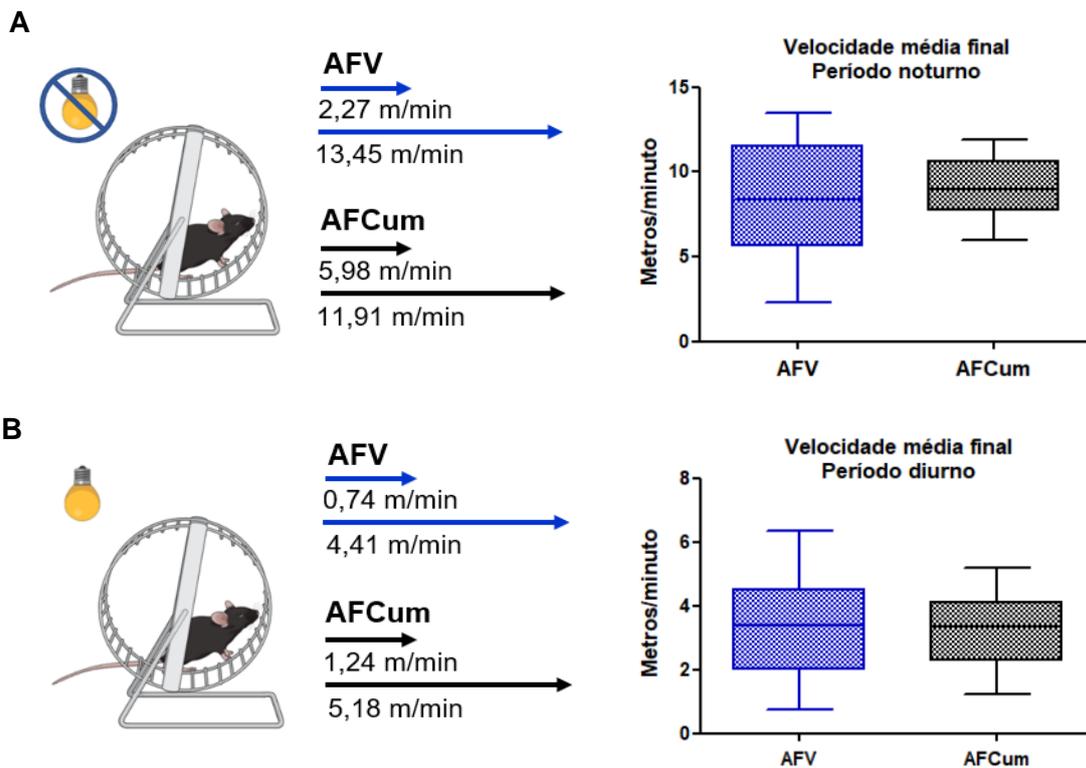


Figura 5. Velocidade média final. Dois grupos (n=8) sendo: AFCum: Atividade Física Cumarina; AFV: Atividade Física Veículo. A) Menor e maior velocidade média apresentada (metros/minutos) no período noturno ao longo do tratamento B) Velocidade média final por grupo AFV/AFC no período noturno C) Menor e maior velocidade média apresentada (metros/minutos) no período diurno ao longo do tratamento D) Velocidade média final por grupo AFV/AFC no período noturno.

3.2 Aspectos comportamentais

O TLCE é um teste utilizado afim de verificar padrões comportamentais relacionados à ansiedade. O teste foi aplicado nos 12º e 28º dias do experimento, afim de acompanhar os animais durante o processo do experimento. Foram analisados dados da frequência de entradas e tempo total gasto nos braços abertos (BA). O número total de entradas nos braços abertos e o tempo de permanência podem ser considerados como indicadores primários do comportamento relacionado à ansiedade em roedores (Figura 6):

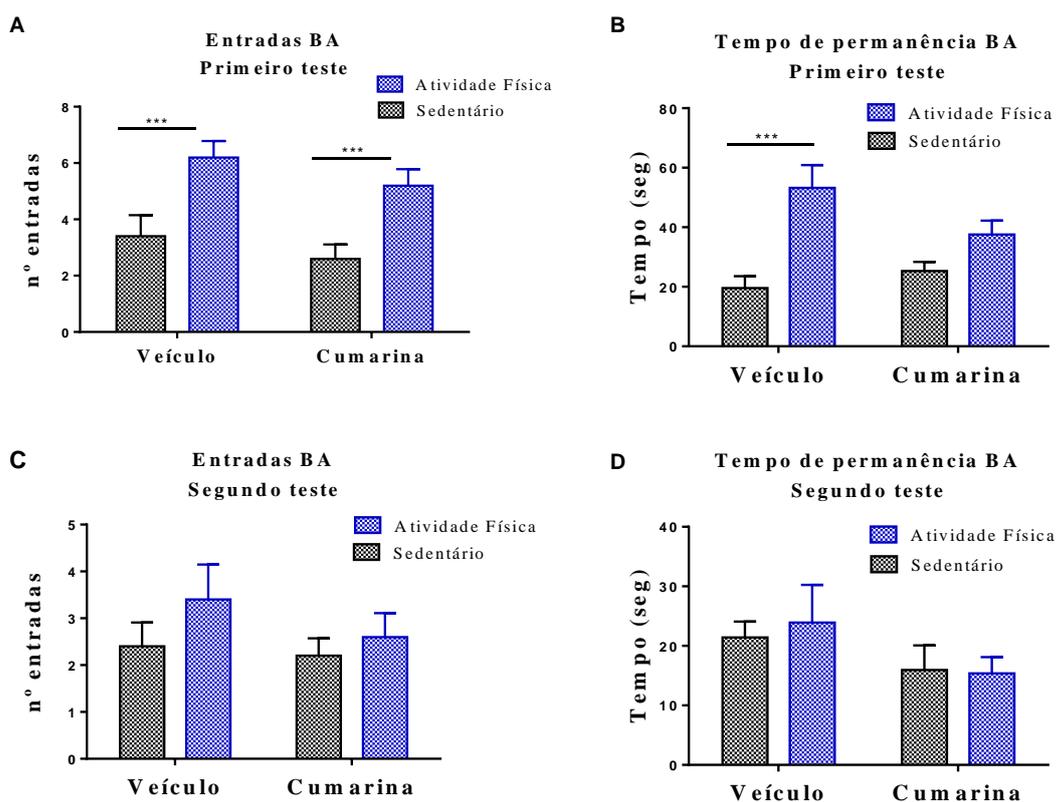


Figura 6. Número de entradas e tempo de permanência nos Braços Abertos (BA) do TCLE. Quatro grupos (n=8) sendo: SV: Sedentário Veículo; SCum: Sedentário Cumarina; AFCum: Atividade Física Cumarina; AFV: Atividade Física Veículo. A) Número de entradas dos animais nos braços abertos no primeiro teste B) Tempo de permanência dos animais nos Braços Abertos (BA) no primeiro dia de teste C) Número de entradas dos animais nos braços abertos no segundo teste D) Tempo de permanência dos animais nos Braços Abertos (BA) no segundo teste. *** $p < 0.01$.

No teste aplicado no 12º de experimento, o número de entradas nos BA foi superior nos grupos expostos à atividade física em ambos tratamentos Veículo/Cumarina (Figura 6A). Porém, ao analisar o tempo de permanência ainda no primeiro teste, os dados mostraram que apenas no tratamento com veículo houve diferença entre o grupo sedentário e o grupo atividade física. Já no segundo teste nenhuma diferença estatisticamente significativa foi identificada.

Também foram extraídos dados relacionados a atividade locomotora, que corresponde ao número total de entradas (total de entradas = número de entradas no aberto + número de entradas no fechado). Quanto maior o número de entradas, maior o Índice de Locomoção (IL). Como esperado, os grupos expostos à atividade física apresentaram maiores IL quando

comparados aos grupos sedentários. Não houve diferença relacionada ao tratamento com a cumarina (Figura 7):

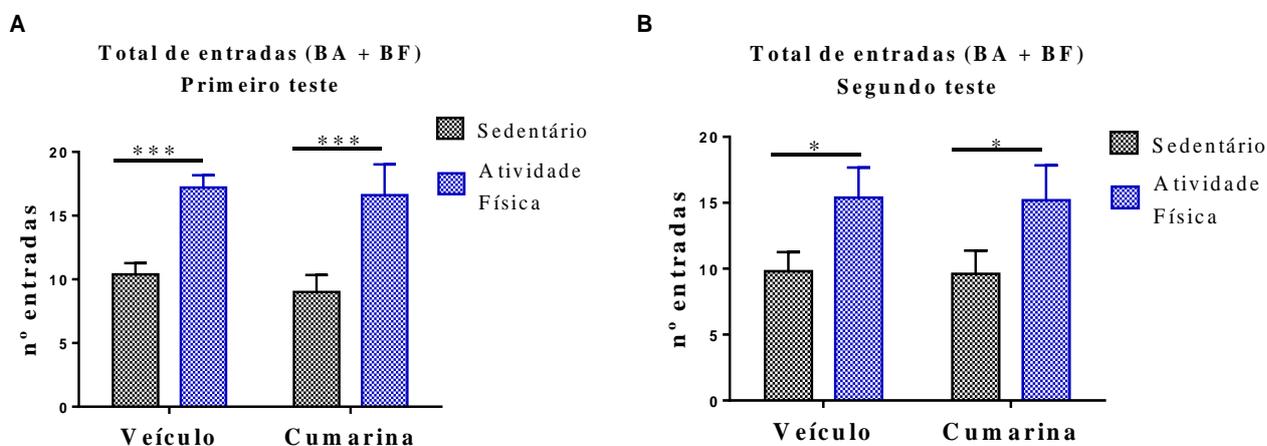


Figura 7. Número de entradas total (Braços Abertos + Braços Fechados), correspondente ao Índice de Locomoção (IL). Quatro grupos (n=8) sendo: SV: Sedentário Veículo; SCum: Sedentário Cumarina; AFCum: Atividade Física Cumarina; AFV: Atividade Física Veículo. A) Número de entradas total no primeiro teste (12º dia) B) Número de entradas total no segundo teste (28º dia). *** p < 0.01; *p < 0.05.

O TRO foi aplicado no 3º e 23º dias do experimento. O TRO é um teste utilizado visando mensurar a capacidade de reconhecimento de um novo objeto em um ambiente controlado. Foram coletados dados referentes ao tempo de latência. O tempo de latência corresponde ao tempo em segundos que cada animal levou para explorar o novo objeto durante a fase de teste. A memória de reconhecimento se correlaciona positivamente com um menor tempo para exploração do novo objeto em detrimento ao objeto antigo. Não houve diferença entre os grupos em relação ao tratamento com a cumarina ou em relação a prática de atividade física voluntária (Figura 8):

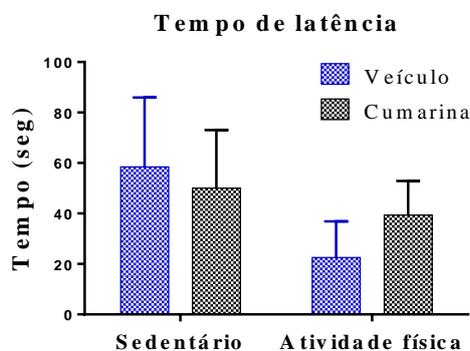


Figura 8. Tempo de latência para reconhecimento do novo objeto. Quatro grupos (n=8) sendo: SV: Sedentário Veículo; SCum: Sedentário Cumarina; AFCum: Atividade Física Cumarina; AFV: Atividade Física Veículo. Anova Two-way em relação aos dois tratamentos, cumarina e atividade física.

3.3 Imunofluorescência

Após a eutanásia, os encéfalos dos animais foram preparados para imunofluorescência e caracterização da proliferação e marcadores celulares relacionados à neurogênese. Foram analisadas as regiões do hipocampo e hipotálamo para células BrdU+ e proporção de células duplamente marcadas BrdU+/DCX+. Foram identificadas células proliferativas BrdU+ no hipocampo e hipotálamo. Porém, não foram identificadas diferenças significativas entre os grupos AFV/FVCum/SV/SCum na região do hipocampo ou hipotálamo em relação a proliferação celular ou neurogênese geral relacionada a neurônios imaturos (Figura 9):

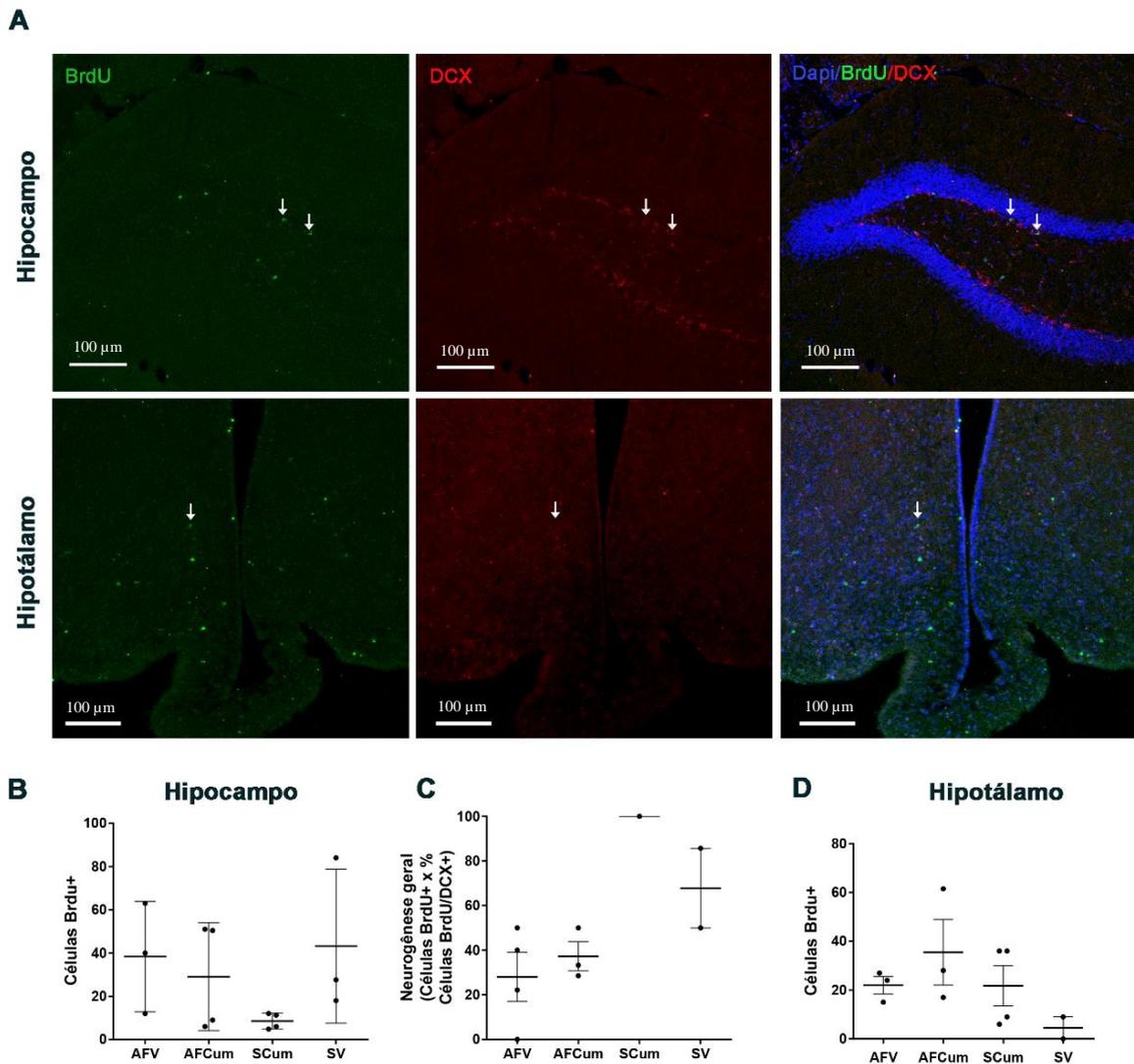


Figura 9. Proliferação celular e neurogênese geral. A) Imunofluorescência hipotálamo e hipocampo com representação visual de Marcação BrdU+, DCX+ e dupla-marcação BrdU+/DCX+. B) Proliferação celular no hipocampo. B) Neurogênese geral. C) Proliferação celular no hipotálamo. Quatro grupos (n=8) sendo: SV: Sedentário Veículo; SCum: Sedentário Cumarina; AFCum: Atividade Física Cumarina; AFV: Atividade Física Veículo.

4 DISCUSSÃO

O período experimental durou 30 dias com administração diária da cumarina 4-metildinafetina (30mg/kg/peso) por gavagem. Parte dos animais também foram expostos roda de atividade física voluntária, afim de identificar possíveis influências no padrão de atividade física relacionado a administração da cumarina. Não houve diferenças no padrão de atividade física relacionados ao volume médio e à velocidade média entre os grupos analisados. Isso indica que 30 mg/kg/dia da cumarina 4-metildinafetina não influenciou de forma direta e isolada no estímulo a atividade física voluntária de camundongos no modelo experimental utilizado.

Alguns fatores podem influenciar nos resultados relacionados à roda de atividade física voluntária, como por exemplo as variações fenotípicas (BOWEN et al., 2016) e genéticas entre os animais (LIGHTFOOT et al., 2004). Apesar disso, ainda podemos considerar como um modelo prático para mensuração de padrões de atividade física voluntária. As rodas livres apresentam vantagens quando comparada a outros modelos de exercício para roedores, como esteira forçada, por apresentar perfil de comportamento próximo ao de corrida habitual dos animais, ser realizada de acordo com a ritmicidade do animal sem a necessidade de estímulos estressantes, pode ser aplicada por períodos longos e não requer manipulação ou interferência do pesquisador (MANZANARES; BRITO-DA-SILVA; GANDRA, 2018).

Não houve diferenças no volume total apresentado pelos grupos AFV/AFCum no período noturno, período no qual camundongos tendem se manter acordados e com maior atividade. Porém o grupo AFV teve o volume total superior ao grupo AFCum no período diurno. Apesar de não demonstrar dados relacionados ao estímulo da atividade física, a redução do volume de atividade pode ser inferida como uma alteração no perfil comportamental e de locomoção dos camundongos que receberam a cumarina.

Além dos clássicos fatores ambientais como luz e temperatura, outras alterações podem influenciar no padrão final de atividade e no comportamento de repouso de animais, como níveis estresse e ansiedade (BEERSMA; GORDIJN, 2007; DEVALLANCE et al., 2017). Fatores endógenos, sítios neurais e neurotransmissores também respondem e regulam a atividade física voluntária (KOTZ et al., 2012). Perez-Leighton e colaboradores (2017) ressaltam que a atividade física voluntária é bastante variável tanto em humanos quanto em roedores e que essa variabilidade pode estar relacionada a função do neurotransmissor orexina.

No hipotálamo, a orexina e hipocretina são os principais peptídeos reguladores da atividade física voluntária, além de modularem do ciclo sono/vigília (PEREZ-LEIGHTON et al., 2017).

Também não houve diferença na velocidade média dos animais nos grupos AFV/AFC ao longo do experimento. Se por um lado a administração da cumarina não potencializou a evolução e ganhos relacionados à atividade física voluntária, sua administração também não gerou alterações que pudessem interferir deficitariamente nesse aspecto. Até o momento, não foram encontrados estudos que investigaram os efeitos diretos da administração de cumarinas sobre a atividade física voluntária, apenas de fatores correlacionados como modulação do perfil comportamental e efeitos neuroprotetores (GAO, Z. et al., 2014; QIN et al., 2017; SKALICKA-WOŹNIAK et al., 2016; SULAKHIYA et al., 2016).

Apesar disso, a velocidade média final apresentada pelos grupos AFV/AFCum pode ser considerada baixa em ambos os grupos e períodos quando comparada a valores encontrados na literatura. No período noturno a velocidade média dos animais não ultrapassou 11,91 m/min e 13,45 m/min (AFCum e AFV, respectivamente). No período diurno os valores foram 1,24 m/min e 5,18 m/min (AFV e AFCum, respectivamente). Camundongos C57BL6 são capazes de atingir velocidade média de corrida de ~1,5 a 3,0 km/h, que correspondem a 25 e 30 m/min (DE BONO et al., 2006; JENESON et al., 2007; LIGHTFOOT et al., 2004). Manzanares, Brito-da-Silva e Gandra (2018) pontuam que diferenças no tempo e na velocidade de corrida entre diferentes exposições à roda de atividade poderiam ser condicionadas a fatores como idade, sexo e variáveis ambientais (MANZANARES; BRITO-DA-SILVA; GANDRA, 2018).

Para compreender parte do perfil comportamental apresentado nas análises relacionadas à atividade física voluntária e verificar se a 4-metildinafetina teria alguma influência, os animais foram submetidos a dois testes comportamentais. O TLCE para dados de comportamento relacionados à ansiedade e atividade locomotora e o TRO para dados de memória de reconhecimento. O TLCE foi aplicado em dois momentos afim de acompanhar os parâmetros ao longo do tratamento. Segundo protocolo estabelecido por Pellow (1985), os padrões de ansiedade observados no teste se referem ao número e tempo de permanência nos braços abertos, onde quanto maiores os níveis de ansiedade, menos entradas e tempo gasto nos braços abertos (PELLOW et al., 1985).

Não foram identificadas diferenças relacionadas ao tratamento com a cumarina no número de entradas nos braços abertos. Porém os animais dos grupos expostos à roda de atividade física voluntária tiveram um número de entradas nos braços abertos superior quando comparados aos animais dos grupos sem acesso à roda, demonstrando um efeito positivo do

exercício na melhora do comportamento ansioso independente da administração da 4-metildinafetina. Essa relação entre exercício e melhora do comportamento relacionado à ansiedade é bem estabelecida na literatura. Estudos demonstram que o exercício físico regular pode atuar como um forte auxiliar para o tratamento do comportamento e transtornos de ansiedade, modulando desde aspectos cognitivos até adaptações fisiológicas (CAREK; LAIBSTAIN; CAREK, 2011; FULK et al., 2004).

Quando analisado o tempo de permanência nos braços abertos, os resultados foram diferentes em relação ao tratamento veículo/cumarina. O grupo AFV teve um tempo de exploração dos braços abertos superior ao grupo SV, demonstrando mais uma vez os efeitos positivos do exercício em modelos com comportamentos relacionados à ansiedade em modelos animais. Porém, não houve diferença entre os grupos SCum/AFCum no tempo de permanência nos braços abertos. Aparentemente a administração da cumarina atenua o efeito ansiolítico da atividade física.

Esse resultado não acompanha alguns estudos envolvendo cumarinas e modelos de comportamentos relacionados à ansiedade. Doses de 50 mg/kg da cumarina esculetina melhorou o comportamento relacionado à ansiedade em camundongos com depressão induzida por lipopolissacarídeo (LPS), (SULAKHIYA et al., 2016). Doses de 15 e 30 mg/kg da cumarina umbeliferona modularam positivamente comportamentos relacionados à ansiedade em animais com indução de estresse, submetidos a diferentes testes comportamentais (QIN et al., 2017). Em outro estudo, pesquisadores exploraram os efeitos das cumarinas imperatonina e a isoimperatonina no comportamento ansioso de roedores. Porém, o perfil ansiolítico do tratamento foi identificado quando as cumarinas eram administradas em conjunto, não sendo observado na administração isolada (SKALICKA-WOŹNIAK et al., 2016).

Para compreender o tratamento da 4-metildinafetina ao longo do tempo e seus efeitos no comportamento dos animais, o TLCE foi repetido no 28º dia. Neste segundo momento não foram identificadas diferenças em nenhum dos grupos. Devallance e colaboradores (2017) ressaltam que aspectos cognitivos e atividade física voluntária podem gerar mecanismos fisiológicos de adaptação (DEVALLANCE et al., 2017).

A atividade locomotora foi analisada nos animais submetidos ao TLCE por meio do Índice de Locomoção (IL), que se refere ao número total de entradas nos braços abertos e braços fechados. Os animais dos grupos exercitados AFV/AFCum apresentaram maior atividade locomotora do que os animais dos grupos sedentários SV/SCum, demonstrando mais um efeito positivo do exercício. Mifune e colaboradores (2015) descrevem que animais submetidos à

atividade física tendem a apresentar maior atividade locomotora e que a prática ao longo do tempo poderia ainda gerar mecanismos de adaptação, reduzindo ou estabilizando atividade física e locomoção (MIFUNE et al., 2015).

A 4-metildinafetina não apresentou efeitos de otimização ou prejuízo na atividade locomotora e memória de reconhecimento. Em um estudo para avaliar o efeito antidepressivo da cumarina umbeliferona, Qin e colaboradores (2017) identificaram melhora no índice de locomoção de camundongos C57BL6 com a administração de 30mg/kg/dia da cumarina. Os autores observaram que o tratamento atenuou o perfil de citocinas inflamatórias no cérebro e reduziu apoptose neuronal previamente induzida por um protocolo de estresse leve, relevando uma possível relação com o perfil anti-inflamatório das cumarinas e melhora de aspectos comportamentais e cognitivos (QIN et al., 2017).

Sachidhara e colaboradores (2015), afim de investigar os efeitos no perfil comportamental e cognitivo de roedores com sintomas relacionados à depressão, como a diminuição da mobilidade geral, sintetizaram uma série de cumarinas e avaliaram seus efeitos. Eles observaram que as respostas fisiológicas variaram entre doses e tipos de cumarinas e a influência direta dos substituintes e sítios conformacionais de cada estrutura química cumarínica influenciou no efeito final (SASHIDHARA et al., 2015). Assim, a variação estrutural poderia ser um fator importante da atividade biológica e determinados mecanismos das cumarinas, fazendo com que os estudos e abordagem destes compostos sejam campos ainda altamente exploráveis e imprevisíveis.

A memória de reconhecimento se refere a capacidade do animal em reconhecer um objeto novo em detrimento a um objeto familiar. Foi avaliada por meio do TRO utilizando o tempo de latência (em segundos) para primeira exploração do novo objeto. Não foram identificadas diferenças entre os grupos que evidenciem otimização ou prejuízo na memória de reconhecimento dos animais. Gomez-Panilla e Hillman (2013) reforçaram a premissa de que a atividade física é capaz de influenciar positivamente mecanismos de aprendizagem e memória, inclusive na melhora da função sináptica dos neurônios e em vias moleculares, sendo o BDNF um dos neurotransmissores mais sensíveis as alterações positivas geradas pela prática regular de atividade física e está envolvido diretamente com mecanismos do metabolismo e da plasticidade sináptica, desempenhando papel crucial no aprimoramento cognitivo induzido pelo exercício (GOMEZ-PINILLA; HILLMAN, 2013).

Apesar de poucos, alguns trabalhos já relacionaram cumarinas à memória de reconhecimento. A 7-hidroxi-5-metoxi-4-metil-3-(4-metilpiperazin-1-il)-cumarina induziu

melhora significativa de aspectos relacionados à memória de ratos tratados com ácido ocaídoico (SONG, X. Y. et al., 2016). A escopoletina foi capaz de melhorar funções cognitivas e de memória em camundongos de 15 e 18 meses de idade com déficits cognitivos induzidos pela depleção de receptores de acetilcolina no SNC (HORNICK et al., 2011). Aparentemente, o TRO tem uma sensibilidade otimizada em modelos experimentais que induzam déficits de memória.

Por fim, a análise por imunofluorescência verificou a proliferação celular e neurogênese no hipotálamo e hipocampo dos grupos. Não foram identificadas diferenças na proliferação celular entre os grupos. Uma parte dos resultados não corrobora outros estudos na literatura que reportaram aumento da neurogênese no hipocampo e hipotálamo de camundongos expostos à roda de atividade voluntária (MA et al., 2017; NIWA et al., 2016; YAU et al., 2014; PRAAG, VAN et al., 1999).

Regiões do hipocampo atualmente também são alvos de diversos antidepressivos ansiolíticos e algumas categorias inclusive, visam modular os efeitos neurogênicos nessa região afim de otimizar o controle dos transtornos relacionados à ansiedade, o que demonstra o efeito positivo da neurogênese em relação aos aspectos cognitivos (SANTARELLI et al., 2003). Entretanto, é necessário ainda elucidar se a proporção do aumento da população de células neuronais seria realmente suficiente para influenciar nas alterações fisiológicas (HILL; SAHAY; HEN, 2015).

A estrutura cerebral, processamento de informações, aprendizagem e memória dependem também do desenvolvimento funcional dos neurônios, plasticidade sináptica e remodelação. O comportamento está diretamente relacionado com a capacidade do cérebro de se submeter a adaptações em resposta a padrões específicos de atividade, melhorando ou não sua capacidade funcional (FERNANDES; CARVALHO, 2016). Nesse sentido, a abordagem funcional da frequência de ativação dos neurônios já existentes talvez seja tão importante quanto a geração de novos neurônios para a funcionalidade geral do SNC.

7. CONCLUSÃO

Conclui-se que a atividade física melhora o comportamento relacionado à ansiedade e a atividade locomotora de camundongos expostos à roda de atividade física voluntária. Porém, a administração da cumarina diminuiu o volume da atividade física no período diurno e reduziu o tempo de permanência dos animais nos braços abertos do labirinto em cruz elevado. Estes

resultados indicam um possível efeito comportamental relacionado a administração da 4-metildinafetina. A cumarina, porém, não alterou a neurogênese e memória de reconhecimento, mas diminuiu o volume total de atividade física no período diurno. Investigações posteriores serão realizadas afim de investigar as bases moleculares relacionadas às alterações constatadas.

AGRADECIMENTOS

Os autores gostariam de agradecer à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte fornecido.

CONFLITOS DE INTERESSE

Os autores declaram não haver conflito de interesse.

DESTAQUES

- A cumarina 4-metildinafetina não influenciou no padrão de atividade física voluntária;
- A 4-metildinafetina aparentemente influencia no comportamento relacionado a ansiedade;
- A atividade física voluntária melhora comportamento relacionado à ansiedade e atividade locomotora;

8. REFERÊNCIAS

ANACKER, C.; HEN, R. Adult hippocampal neurogenesis and cognitive flexibility - linking memory and mood. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 18, n. 6, p. 335–346, maio 2017.

BEERSMA, D. G. M.; GORDIJN, M. C. M. Circadian control of the sleep–wake cycle. **Physiology & Behav. Nature reviews. Neuroscience**, v. 18, n. 6, p. 335–346, 2017. **viior**, v. 90, n. 2–3, p. 190–195, 28 fev. 2007.

BOWEN, R. S.; et al. Stabilization of the wheel running phenotype in mice. **Physiology & Behavior**, v. 155, p. 149–156, 1 mar. 2016.

CAREK, P. J.; LAIBSTAIN, S. E.; CAREK, S. M. Exercise for the Treatment of Depression and Anxiety. **The International Journal of Psychiatry in Medicine**, v. 41, n. 1, p. 15–28, 31

jan. 2011..

DE BONO, J. P.; et al. Novel quantitative phenotypes of exercise training in mouse models. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 290, n. 4, p. R926–R934, abr. 2006.

DETSI, A.; KONTOGIORGIS, C.; HADJIPAVLOU-LITINA, D. Coumarin derivatives: an updated patent review (2015-2016). **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, v. 27, n. 11, p. 1201–1226, 2 nov. 2017.

DEVALLANCE, E.; et al. Effect of chronic stress on running wheel activity in mice. **PLoS one**, v. 12, n. 9, p. e0184829, 2017.

FERNANDES, D.; CARVALHO, A. L. Mechanisms of homeostatic plasticity in the excitatory synapse. **Journal of Neurochemistry**, v. 139, n. 6, p. 973–996, 1 dez. 2016.

FULK, L. J.; et al. Chronic Physical Exercise Reduces Anxiety-Like Behavior In Rats. **International Journal of Sports Medicine**, v. 25, n. 1, p. 78–82, jan. 2004.

GAO, Q.; et al. Nodakenin Enhances Cognitive Function and Adult Hippocampal Neurogenesis in Mice. **Neurochemical Research**, v. 40, n. 7, p. 1438–1447, 22 jul. 2015.

GAO, Z.; et al. Osthole augments therapeutic efficiency of neural stem cells-based therapy in experimental autoimmune encephalomyelitis. **Journal of pharmacological sciences**, v. 124, n. 1, p. 54–65, 2014.

GOMEZ-PINILLA, F.; HILLMAN, C. The Influence of Exercise on Cognitive Abilities. **Comprehensive Physiology**, v. 3, n. 1, p. 403, 2013.

HAGG, T. Molecular regulation of adult CNS neurogenesis: an integrated view. **Trends in Neurosciences**, v. 28, n. 11, p. 589–595, nov. 2005.

HILL, A. S.; SAHAY, A.; HEN, R. Increasing Adult Hippocampal Neurogenesis is Sufficient to Reduce Anxiety and Depression-Like Behaviors. **Neuropsychopharmacology**, v. 40, n. 10, p. 2368–2378, set. 2015.

HORNICK, A.; LIEB, A.; VO, N. P.; ROLLINGER, J. M.; STUPPNER, H.; PRAST, H. The coumarin scopoletin potentiates acetylcholine release from synaptosomes, amplifies hippocampal long-term potentiation and ameliorates anticholinergic- and age-impaired memory. **Neuroscience**, v. 197, p. 280–292, 1 dez. 2011.

JENESON, J. A. L.; et al. Treadmill but not wheel running improves fatigue resistance of isolated extensor digitorum longus muscle in mice. **Acta Physiologica**, v. 190, n. 2, p. 151–161, jun. 2007.

JIN, X.; et al. 7,8-Dihydroxy-4-methylcoumarin Provides Neuroprotection by Increasing Hippocampal Calcitonin Receptor-Like Receptor 1 Expression. **Neurotoxicity Research**, v. 27, n. 3, p. 268–274, 10 abr. 2015.

KATHURIA, A.; et al. Specificities of Calreticulin Transacetylase to acetoxy derivatives of 3-alkyl-4-methylcoumarins: Effect on the activation of nitric oxide synthase. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 4, p. 1550–1556, 15 fev. 2009.

KEMPERMANN, G., et al. Early determination and long-term persistence of adult-generated new neurons in the hippocampus of mice. **Dev. Camb. Engl.** 130, 391–399, 2003.

KOTZ, C.; NIXON, J.; et al, C. Brain orexin promotes obesity resistance. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1264, n. 1, p. 72–86, ago. 2012.

LEE, D. A.; et al. Tanycytes of the hypothalamic median eminence form a diet-responsive neurogenic niche. **Nature neuroscience**, v. 15, n. 5, p. 700–2, 25 mar. 2012.

LEGER, M.; QUIEDEVILLE, A.; BOUET, V.; HAELEWYN, B.; BOULOUARD, M.; SCHUMANN-BARD, P.; FRERET, T. Object recognition test in mice. **Nature Protocols**, v. 8, n. 12, p. 2531–2537, 21 dez. 2013.

LIGHTFOOT, J. T.; et al. Genetic influence on daily wheel running activity level. **Physiological Genomics**, v. 19, n. 3, p. 270–276, 17 nov. 2004.

LIU, H.; XUE, X.; SHI, H.; QI, L.; GONG, D. Osthole Upregulates BDNF to Enhance Adult Hippocampal Neurogenesis in APP/PS1 Transgenic Mice. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 38, n. 10, p. 1439–1449, 2015.

MA, C.-L.; et al. Physical exercise induces hippocampal neurogenesis and prevents cognitive decline. **Behavioural Brain Research**, v. 317, p. 332–339, 15 jan. 2017.

MANZANARES, G.; BRITO-DA-SILVA, G.; GANDRA, P. G. Voluntary wheel running: patterns and physiological effects in mice. **Brazilian journal of medical and biological research**, v. 52, n. 1, p. e7830, 10 dez. 2018.

MIFUNE, H.; et al. Voluntary exercise contributed to an amelioration of abnormal feeding behavior, locomotor activity and ghrelin production concomitantly with a weight reduction in high fat diet-induced obese rats. **Peptides**, v. 71, p. 49–55, set. 2015.

MYSLIVECEK, J.; FARAR, V.; VALUSKOVA, P. M(4) muscarinic receptors and locomotor activity regulation. **Physiological research**, v. 66, n. Supplementum 4, p. S443–S455, dez. 2017.

PEREZ-LEIGHTON, C.; LITTLE, M. R.; GRACE, M.; BILLINGTON, C.; KOTZ, C. M. Orexin signaling in rostral lateral hypothalamus and nucleus accumbens shell in the control of spontaneous physical activity in high- and low-activity rats. **American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology**, v. 312, n. 3, p. R338–R346, 2017.

PELLOW, S.; CHOPIN, P.; FILE, S. E.; BRILEY, M. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **Journal of neuroscience methods**, v. 14, n. 3, p. 149–67, ago. 1985.

POTDAR, M. K.; MOHILE, S. S.; SALUNKHE, M. M. Coumarin syntheses via Pechmann condensation in Lewis acidic chloroaluminate ionic liquid. **Tetrahedron Letters**, v. 42, n. 52, p. 9285–9287, 24 dez. 2001.

QIN, T.; et al. Umbelliferone reverses depression-like behavior in chronic unpredictable mild stress-induced rats by attenuating neuronal apoptosis via regulating ROCK/Akt pathway.

Behavioural Brain Research, v. 317, p. 147–156, 2017.

SANTARELLI, L.; et al. Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants. **Science (New York, N.Y.)**, v. 301, n. 5634, p. 805–9, ago. 2003.

SASHIDHARA, K. V.; et al. Design and synthesis of new series of coumarin–aminopyran derivatives possessing potential anti-depressant-like activity. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 25, n. 2, p. 337–341, 15 jan. 2015.

SKALICKA-WOŹNIAK, K.; et al. Implication of coumarins towards central nervous system disorders, v. 37, n. 1, **Pharmacological Research**, 2016.

SONG, Y. et al. Natural neuro-inflammatory inhibitors from *Caragana turfanensis*. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, [s.l.], v. 27, no 20, p. 4765–4769, 2017.

SULAKHIYA, K.; et al. Lipopolysaccharide induced anxiety- and depressive-like behaviour in mice are prevented by chronic pre-treatment of esculetin. **Neuroscience Letters**, v. 611, p. 106–111, jan. 2016.

TOGNA, A. R.; et al. 4-Methylcoumarin derivatives with anti-inflammatory effects in activated microglial cells. **Biological & pharmaceutical bulletin**, v. 37, n. 1, p. 60–6, 2014.

TYAGI, Y. K.; et al. Synthesis of novel amino and acetyl amino-4-methylcoumarins and evaluation of their antioxidant activity. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 40, n. 4, p. 413–420, 1 abr. 2005.

VAN PRAAG, H.; et al. Running enhances neurogenesis, learning, and long-term potentiation in mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, n. 23, p. 13427–31, nov. 1999.

WELSH, D.; RICHARDSON, G. S.; DEMENT, W. C. Effect of running wheel availability on circadian patterns of sleep and wakefulness in mice. **Physiology & behavior**, v. 43, n. 6, p. 771–77, 1988.

WU, L.; et al. The structure and pharmacological functions of coumarins and their derivatives. **Current medicinal chemistry**, v. 16, n. 32, p. 4236–60, 2009.

YAO, Y.; et al. Osthole promotes neuronal differentiation and inhibits apoptosis via Wnt/ β -catenin signaling in an Alzheimer's disease model. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 289, n. 3, p. 474–481, 15 dez. 2015.

YAU, S. Y.; GIL-MOHAPEL, J.; CHRISTIE, B. R.; SO, K. F. Physical exercise-induced adult neurogenesis: A good strategy to prevent cognitive decline in neurodegenerative diseases? **BioMed Research International**, v. 2014.